ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUT OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Ecotoxicologie/Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Camille LARUE

le 18 novembre 2011

IMPACT DE NANOPARTICULES DE TiO_2 ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX

Directeur de thèse : **Sylvain CHAILLOU**
Co-encadrement de la thèse : **Marie CARRIERE**

Jury

Mme Marie CARRIERE, Docteur, CEA, Grenoble	Co-directrice de thèse
M. Sylvain CHAILLOU, Professeur, AgroParisTech, Paris	Directeur de thèse
M. Erik JONER, Docteur, Bioforsk, Norvège	Rapporteur
M. Jérôme ROSE, Directeur de recherches, CEREGE, Aix en Provence	Examinateur
Mme Géraldine SARRET, Docteur, Université Joseph Fourier, Grenoble	Examinatrice
M. Alain THIERY, Professeur, Université de Provence, Marseille	Rapporteur
M. Gerard THOMAS, Directeur des affaires techniques et réglementaires, Syngenta	Examinateur
Mme Laurence GALSOMIES, Docteur, ADEME, Paris	Invitée

CEA Saclay/ DSM/IRAMIS/SIS2M/LSDRM
F-91191 Gif sur Yvette

REMERCIEMENTS

La première fois que j'ai rencontré Marie, elle m'a dit « tu verras, la thèse c'est une formidable aventure ». Et elle disait vrai ! La thèse, c'est à la fois une formidable aventure scientifique mais également une superbe aventure humaine.

Je vais donc profiter de ces quelques lignes pour remercier tous ceux qui ont participé à ma formidable aventure à moi ☺

En tout premier lieu, je tiens à remercier ma maitre Jedi, Marie Carrière, qui m'a donné ma chance pour cette thèse et qui m'a suivi au jour le jour. Tu m'as fait découvrir le monde fabuleux des microsondes nucléaires et autres synchrotrons et ce fut pour moi un émerveillement. Merci pour ta confiance et la liberté que tu m'as laissée. Et puis merci aussi pour tout le reste : grandes discussions et petits potins de labo !

Merci également à Sylvain Chaillou d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse pendant ces trois années.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail : Alain Thiéry (Université de Provence, Marseille) et Erik Joner (Bioforsk, Norvège), mes rapporteurs ainsi que Géraldine Sarret (Université Joseph Fourier, Grenoble), Jérôme Rose (CEREGE, Aix en Provence), Gérard Thomas (Syngenta, Guyancourt) et Laurence Galsomies (ADEME, Paris).

Cette thèse a été rendue possible grâce au financement du CEA et de l'ADEME, je les en remercie vivement.

Nous étions une toute petite équipe, et j'ai ainsi partagé la plupart de mes aventures avec Julien Laurette et Emilie Brun. On était un peu comme une petite famille ! Le sacro saint café du matin (hein Julien ?!!), le repas à 11h45 et puis tous les allers-retours entre nos bureaux pour une petite question technique, un « papotage » ou un « remontage » de moral ! Mais aussi les expéditions MET et MEB avec Ju ou encore les séances ICP-MS avec Emilie (on a dû y laisser une partie de nos cheveux à se les arracher !!). Sans compter les nuits passées ensemble…à travailler bien sûr ☺ ! Merci à vous pour tous ces moments, ma thèse n'aurait pas été aussi joyeuse sans vous !

Il me faut également remercier ma « famille élargie » de l'ex Laboratoire Pierre Sue : Hervé et Franco qui partageaient nos cafés matinaux, Didier et François toujours prêts pour une bonne blague (je n'ai toujours pas élucidé le mystère des chips en polystyrène apparus comme par magie dans le

coffre de ma voiture !) ou trafics en tout genre, Jim l'homme le plus pipelette que je connaisse ☺ (je me demande même si tu ne me bats pas dans ce domaine !), Eddy (prend soin de Monsieur Banane !!) et Yvan qui s'invitaient de temps en temps à l'improviste au café du 639, Valérie qui était toujours prête à nous aider, Jean-Louis qui nous ramenait souvent des douceurs (chouquettes et galettes ! miam), Gérard qui surveillait notre santé radiologique (et nous faisait de la concurrence dans la culture de plantes), Christian qui nous surveillait tout court (promis Christian, on ne fera plus de cocktails dans des grandes éprouvettes graduées ☺). Et puis aussi Mary-Line et Sylvain qui faisaient partie de l'équipe au début de ma thèse puis nous ont quitté pour d'autres horizons.
J'ai souvent une pensée émue pour tous les pots, galettes et barbecues qui nous rassemblaient tous !

Un merci tout spécial aussi au Dr. Emilie Bigorgne ☺ J'ai adoré faire ces conférences avec toi : à stresser ensemble pour nos présentations et à profiter ensemble de tous les à-cotés (notre marathon washingtonien, notre soirée grenobloise ou encore nos tapas sévillanes !).

Mes remerciements vont ensuite à tous ceux qui ont pris de leur temps pour partager avec moi leurs savoirs et leurs petits « trucs », j'ai cité :

- Danielle Jaillard, au microscope électronique à transmission et surtout à la préparation des échantillons. Merci Danielle pour tout le temps que tu nous as accordé (même un dimanche, honte à moi…). Avec toi, on se sentait un peu comme à la maison au CCME !

- François Brisset, au microscope électronique à balayage à l'ICCMO, qui a assisté à nos éclats de joie et nos airs béats d'admiration devant nos coupes de plantes ! On était trop fans !

- Clarisse Mariet à l'initiation à l'ICP-MS. On a essayé d'être des élèves à la hauteur ! Je ne sais pas si on a vraiment réussi mais une chose est sure, on a beaucoup appris de l'ICP !

- l'équipe microsonde nucléaire : Hicham Khodja, Suzy Surblé ainsi que les McGyvers François Saillant, Didier Guillier, Yvan Kilisky et Jim Hoarau ! On en a passé du temps ensemble entre émerveillement et prières pour que tout se passe bien, parfois même jusque tard dans la nuit !

- l'équipe du SPAM et notamment Nathalie Herlin et Axelle Casanova. Mine de rien, j'ai quand même passé pas mal d'heures chez vous, plantée devant le Zetasizer !

- les deux équipes synchrotron : the LUCIA team (Anne-Marie Flank) et the ID21 team (Barbara Fayard et Giulia Veronesi). Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos explications ! Je me

rappelle notamment d'une arrivée sur LUCIA pendant laquelle je fus assaillie d'obscures questions de calculs d'arctangente pour orienter l'échantillon face au faisceau (calculs qu'il fallait refaire tout au long de la nuit…).

- l'équipe « manip carbone 14 », merci à Dominique Georgin et Frédéric Taran pour m'avoir laissé improviser une manip avec mes petites plantes dans votre monde ! Et merci à Bertrand Czarny pour les résultats d'autoradiographie, qui m'ont scotchée à ma chaise la première fois qu'on en a parlé au téléphone !

- l'équipe comité de pilotage et notamment Sylvie Cotelle et Nathalie Korboulewsky qui ont partagé leurs lumières avec moi.

Mon aventure s'est terminée à Toulouse à l'ECOLAB où Eric Pinelli, Jérôme Silvestre (avec un i) et George Merlina (sans s) m'ont gentiment accueillie pour quelques manips subsidiaires ! Je suis passée de mon bureau perso à Saclay à un bureau contenant au minimum 5 personnes en permanence et jusqu'à 8 à son heure de gloire. Ce fut l'occasion de nombreux échanges dont des heures de discussion avec Clémence, des sorties piscine bi-hebdomadaires avec Adeline, des sorties tous ensemble avec Marion et Yannick au chinois ou aux sushis ou encore de riches débats concernant par exemple le sens du périphérique Toulousain ! J'y ai également croisé avec plaisir Bruno Faucon, Annie Perrault et Annick Correge.

Mais il n'y a pas que la thèse et le labo dans la vie ! Je tiens donc à remercier aussi mes amis. Mes fidèles amies depuis le lycée voire même la maternelle de Chanteau pour certaines : Ludi, Aurore et Aurore ! Mes amis « des régions » : Laurent le Cucuronnais, Julien l'Agennais et Caro l'Alsacienne. Ca a été l'occasion de supers WE partout en France (dont un WE consacré à un mariage☺)! Mes amis « européens » : Fred et Julie respectivement en Suède et en Norvège. Ces WE partagés avec vous dans les capitales européennes sont difficiles à caler mais d'autant plus agréables ! Et enfin merci à Thomas et Almu pour tous ces joyeux WE (Bruxelles, Amsterdam, Saragosse, Paris mais aussi Rocamadour et surtout Châteauroux ou encore le mythique Bourges-Sancerre et je suis sure que j'en oublie plein d'autres !).

Et enfin, je ne peux conclure cette partie de remerciements sans évoquer ma famille proche…

Je commence par ma Maman, ma complice, qui a eu le droit à des comptes rendus détaillés de mes manips, des résumés de mes résultats ou encore un suivi régulier des histoires de labo. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Ce diplôme, c'est aussi un peu le tien ! Merci aussi à mon frère, Clément ! Je continuerai à essayer de t'impressionner avec mes histoires de synchrotron. Mais

c'est certainement moi qui serai la plus impressionnée quand je vous verrai Papa et Maman avec Laetitia en juin ☺.

Je remercie aussi du fond du cœur ma belle famille en commençant par beau papa Christophe et belle maman Chantal. Merci de m'avoir bichonnée pendant la fin de la rédaction de ma thèse (petits plats et bonnes bouteilles, finalement ce n'est pas si pénible que ça la rédaction !) et plus généralement merci de m'avoir accueillie dans la famille ! Merci aussi à mon « bof » préféré Maxime (merci pour les relectures de mes articles en anglais ☺) et à ma « bel's » Lucile (notamment pour cette mémorable soirée mariage champêtre). J'aimerais aussi remercier Renée et Louis que je considère un peu comme mes grands parents adoptifs (sans doute l'amour - et la défense - de la Bretagne nous relient-ils !).

Et je finis par un immense merci à mon homme… Merci Xav. Je suis infiniment heureuse de t'avoir à mes côtés dans la vie pour tout un tas de raisons que je ne peux détailler ici sous peine de doubler le nombre de pages de ce mémoire ☺. Alors je me contenterai de te remercier pour toutes ces années que l'on a partagées à deux en toutes circonstances et à toutes les aventures nombreuses et variées que nous avons vécues ensemble. Ce projet de thèse te doit beaucoup…

SOMMAIRE

INTRODUCTION 7

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 11

1. Les nanomatériaux 13

1.1. Apparition et développement des nanotechnologies 13

1.2. Définitions 16

1.3. Propriétés des nanomatériaux 17

1.4. Production des nanomatériaux 18

1.5. Impact des nanomatériaux 20

1.6. Nanomatériaux utilisés pour cette étude 21

1.6.1. Le dioxyde de titane 21

1.6.2. Les nanotubes de carbone 23

2. Impact environnemental des nanomatériaux 25

2.1. Dissémination dans l'environnement 26

2.1.1. Dissémination involontaire 26

2.1.2. Dissémination volontaire 27

2.2. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème eau 28

2.2.1. Nanomatériaux et eaux de surface 28

2.2.2. Impact des nanomatériaux sur les bactéries de l'eau 30

2.2.3. Impact des nanomatériaux sur les algues 31

2.2.4. Impact des nanomatériaux sur les crustacés 33

2.2.5. Impact des nanomatériaux sur les poissons 34

2.2.6. Impact des nanomatériaux sur d'autres organismes aquatiques 36

2.2.7. Impact des nanomatériaux sur une chaine trophique aquatique simplifiée 37

2.3. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème sol 38

2.3.1. Nanomatériaux et sols 38

2.3.2. Impact des nanomatériaux sur les bactéries du sol 40

2.3.3. Impact des nanomatériaux sur les nématodes 41

2.3.4. Impact des nanomatériaux sur une chaine trophique terrestre simplifiée 42

2.4. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème air 42

3. Impact des nanomatériaux sur les végétaux 44

3.1. Effets positifs des nanomatériaux sur les végétaux 45

3.2. Effets délétères des nanomatériaux sur les végétaux 46
3.2.1. Effets délétères sur le développement et le métabolisme 46
3.2.2. Effets génotoxiques 48
3.3. Accumulation des nanomatériaux dans les végétaux 48
3.4. Utilisation des nanomatériaux en biotechnologie 50
4. Synthèse du chapitre 51
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 53
1. Nanomatériaux employés ; caractérisation physico-chimique 55
1.1. Synthèse des nanopoudres 55
1.1.1. Nanoparticules de dioxyde de titane 55
1.1.2. Nanotubes de carbone 56
1.2. Analyse des nanopoudres 57
1.2.1. Surface spécifique, méthode BET 57
1.2.2. Phase cristalline, diffraction des rayons X 58
1.2.3. Coordination de l'élément, absorption des rayons X 59
1.3. Mise en suspension des nanopoudres 61
1.4. Analyse des suspensions de nanomatériaux 62
1.4.1. Charge de surface ou potentiel zeta 62
1.4.2. Diamètre hydrodynamique et état d'agglomération 63
2. Modèles biologiques, conditions de culture et d'exposition 64
2.1. Espèces végétales 64
2.1.1. Monocotylédones/dicotylédones 64
2.1.2. Le blé 67
2.1.3. Le colza 68
2.2. Conditions de culture 69
2.3. Conditions d'exposition 69
2.3.1. Exposition racinaire en hydroponie 69
2.3.2. Exposition aérienne 70
2.3.3. Exposition racinaire sur sol 70
3. Analyse de la répartition et de l'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux 71
3.1. Techniques basées sur les interactions rayonnement-matière 71
3.1.1. Principes des interactions rayonnement-matière 71
3.1.2. Techniques utilisées 73

3.1.2.1. Microscopie Electronique à Transmission 73
3.1.2.2. Microscopie Electronique à Balayage 74
3.1.2.3. Micro-fluorescence X par rayonnement synchrotron 76
3.1.2.4. Analyses par faisceau d'ions sur une microsonde nucléaire 78
3.1.3. Préparation des échantillons 84
3.1.3.1. Préparation pour la microscopie électronique à transmission 84
3.1.3.2. Préparation pour toutes les autres techniques 86
3.2. Autoradiographie 88
3.2.1. Principe 88
3.2.2. Préparation des échantillons 89
3.3. Quantification par spectroscopie de masse couplée à un plasma inductif 89
3.3.1. Principe 89
3.3.2. Mesures 90
3.3.3. Préparation des échantillons 91
4. Impact des nanomatériaux sur le développement et la physiologie des végétaux 91
4.1. Impact sur le développement 91
4.2. Impact sur la photosynthèse: teneur en pigments chlorophylliens 92
4.3. Evaluation du stress oxydant : dosage du peroxyde de dihydrogène et de la peroxydation lipidique 93
4.4. Impact sur la nutrition hydrominérale : dosage par chromatographie ionique 94
4.4.1. Principe 94
4.4.2. Préparation des échantillons 95
5. Statistiques 95
6. Synthèse du chapitre 95
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES NANOMATERIAUX 97
1. Les nanoparticules de TiO_2 99
1.1. Caractérisation des nanopoudres de TiO_2 99
1.1.1. Surface spécifique et diamètre (BET) 99
1.1.2. Phase cristalline 100
1.2. Optimisation de la dispersion des NPs de TiO_2 100
1.2.1. Sonification en milieu simple 100
1.2.2. Test de surfactants biocompatibles 102
1.2.3. Test de solutions nutritives 103
1.3. Diamètre hydrodynamique 104

1.4. Charge de surface 105
1.5. Dimensions des NPs de TiO_2 en suspension 106
2. Les nanotubes de carbone 107
2.1. Caractérisation des poudres de NTC : surface spécifique 107
2.2. Optimisation de la dispersion des NTC 108
2.3. Dimensions des NTC en suspension 108
3. Synthèse du chapitre 110
CHAPITRE 4 : IMPACT DES NANOPARTICULES DE TiO_2 113
1. Pénétration et translocation des NPs de TiO_2 dans le blé 115
2. Influence du diamètre des NPs de TiO_2 sur leur accumulation et leur phytotoxicité sur le blé 131
2.1. Pénétration racinaire du titane chez le blé cultivé en hydroponie 131
2.1.1. Quantification du titane dans les racines de blé 131
2.1.2. Distribution du titane dans les racines de blé 132
2.1.3. Influence du diamètre hydrodynamique : exposition dans du Hoagland 134
2.2. Transfert du titane vers les parties aériennes du blé 135
2.3. Coordination du titane 136
2.3.1. Analyse des nanopoudres de TiO_2 de référence 136
2.3.2. Analyse du titane dans les exsudats racinaires, les racines et les feuilles 139
2.4. Impact des NPs de TiO_2 sur le développement et la physiologie du blé 140
2.4.1. Impact sur le développement : germination, longueur des racines, biomasse et évapotranspiration 141
2.4.2. Impact sur la physiologie : photosynthèse et nutrition hydrominérale 143
2.5. Discussion des résultats 144
2.5.1. Internalisation des NPs dans les racines 144
2.5.2. Transport radial des NPs dans les racines 145
2.5.3. Concentration des NPs dans les racines 146
2.5.4. Transport vertical des NPs vers les feuilles 146
2.5.5. Structure du titane 148
2.5.6. Impact des NPs sur le développement du blé 148
2.5.7. Impact des NPs sur la physiologie du blé 151
2.5.8. Influence des caractéristiques physico-chimiques des NPs sur leur impact sur le blé 151
2.5.9. Conclusion 153

3. Influence de l'espèce végétale sur l'accumulation et la phytotoxicité des NPs de TiO_2 154
3.1. Exposition racinaire du colza aux NPs de TiO_2 155
3.1.1. Quantification du titane dans les racines de colza 155
3.1.2. Distribution du titane dans les tissus végétaux du colza 155
3.1.3. Impact des NPs de TiO_2 sur le développement du colza 157
3.2. Influence de la voie d'exposition : exposition aérienne du colza à des NPs de TiO_2 158
3.3. Discussion des résultats 159
3.3.1. Influence de l'espèce végétale sur l'accumulation et la phytotoxicité des NPs 159
3.3.2. Influence de la voie d'exposition sur l'accumulation des NPs 161
4. Influence du substrat sur l'accumulation de NPs de TiO_2 dans le blé 162
4.1. Devenir des NPs de TiO_2 dans différents sols 163
4.1.1. Mise au point expérimentale pour le dosage par ICP-MS des NPs 163
4.1.2. Dosage du titane dans les sols et les lixiviats 164
4.2. Quantification du titane dans les racines de blé cultivé sur sols 166
4.3. Répartition du titane dans les racines de blés cultivés sur sols 166
4.4. Coordination du titane 168
4.5. Discussion 170
5. Synthèse du chapitre 171
CHAPITRE 5 : IMPACT DES NANOTUBES DE CARBONE 173
1. Accumulation et impact des MWCNTs chez deux végétaux : le blé et le colza 175
2. Influence du diamètre extérieur des NTC et de leurs propriétés de surface sur les effets générés sur le blé et le colza 193
2.1. Impact sur le développement du blé et du colza 193
2.2. Impact sur la physiologie du blé 194
2.3. Discussion des résultats 195
3. Synthèse du chapitre 196
CONCLUSION 199
LEXIQUE 205
BIBLIOGRAPHIE 207
ANNEXES 229
RESUME 290

INTRODUCTION

Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, les nanotechnologies suscitent l'engouement des scientifiques et des industriels du monde entier. En effet, la manipulation de la matière à l'échelle du nanomètre ouvre de nouvelles portes et d'infinies possibilités dans de nombreux domaines très variés comme l'industrie, la médecine ou encore le développement durable, pour ne citer qu'eux. Ces nanotechnologies emploient de grandes quantités de nanomatériaux dont les caractéristiques peuvent être très différentes, générant ainsi l'apparition de toute une nouvelle classe de matériaux aux propriétés très particulières.

Les nouvelles propriétés exhibées par les nanomatériaux sont également une source d'interrogations quant à une toxicité différente. Ainsi, en parallèle du développement des nanotechnologies, a débuté l'étude de la toxicité des nanomatériaux et avec quelques années de retard, l'étude de leur écotoxicité. La mise sur le marché de produits contenant (officiellement) des nanomatériaux est passée de 54 en 2005 à 1317 en 2011 (www.nanotechproject.org). Cette forte augmentation est aussi synonyme d'une production accrue de nanomatériaux et donc d'un risque plus important d'accidents lors de la production ou du transport qui pourraient mener à une pollution de l'environnement. Le cycle de vie de ces produits à base de nanomatériaux pourrait aussi être à l'origine d'une contamination chronique de l'eau, du sol et de l'air ambiant. Enfin, la dissémination volontaire de nanomatériaux dans l'environnement est aujourd'hui avérée, notamment pour la remédiation de sites pollués. Dans ce cadre, il est donc primordial de répondre à la question de l'impact de ces nanomatériaux sur l'environnement.

Un aspect très important pour évaluer de façon pertinente la toxicité des nanomatériaux est la prise en compte de leurs caractéristiques physico-chimiques telles que la composition chimique, la forme, le diamètre nominal ou encore la phase cristalline. En effet, à de nombreuses reprises, il a été mis en évidence que ces caractéristiques pourraient expliquer leur toxicité. Néanmoins, jusqu'à ces dernières années, peu d'études (éco)toxicologiques détaillaient cet aspect. En 2009, sur 40 études toxicologiques, 20 ne comportaient aucune caractérisation et 10 autres ne reportaient qu'une seule caractéristique (Singh *et al.*, 2009). Il existe donc un réel manque d'informations à ce niveau, provenant également du fait que l'on manque actuellement de méthodes suffisamment sensibles et informatives pour caractériser les nanomatériaux mais surtout pour mesurer leur libération dans l'environnement.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'impact des nanomatériaux sur les végétaux. En effet, ils représentent un lien entre les trois écosystèmes eau-sol-air et se trouvent également à la base des chaines trophiques. Il est donc essentiel de s'intéresser aux conséquences d'une contamination aux nanomatériaux sur ce maillon. De plus, au début de ces travaux, peu de données étaient disponibles sur le sujet.

Le but de cette thèse peut donc être résumé ainsi :

Etudier l'accumulation et la phytotoxicité des nanomatériaux sur deux espèces végétales en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Pour mener à bien ce projet, nous avons décidé de nous concentrer sur deux types de nanomatériaux qui sont actuellement produits en grande quantité : les nanoparticules (NPs) sphériques de dioxyde de titane (TiO_2) et les nanotubes de carbone (NTC). Concernant les végétaux,

notre choix s'est porté sur deux plantes d'intérêt agronomique et industriel, appartenant aux deux grandes catégories d'angiospermes : le blé (monocotylédone) et le colza (dicotylédone).

Ce manuscrit s'articule autour de 5 grandes parties :

-une synthèse bibliographique qui définira brièvement les nanotechnologies et les nanomatériaux et présentera l'état des connaissances concernant leurs impacts sur l'environnement et plus particulièrement sur les végétaux.

- la présentation du matériel et des méthodes employés lors de ces travaux. Cette thèse se situant à l'interface entre la physico-chimie et la biologie, l'accent a été mis sur l'utilisation de techniques physiques (notamment basées sur l'interaction rayonnement-matière) au service de la biologie.

- la caractérisation physico-chimique détaillée des nanomatériaux utilisés que l'on mettra ensuite en vis-à-vis des résultats de l'étude écotoxicologique.

- l'étude de l'accumulation et de la phytotoxicité des NPs de TiO_2 sur le blé et le colza. Plusieurs types de contamination seront envisagés : exposition racinaire en hydroponie, exposition racinaire sur sol ou encore exposition aérienne par dépôt humide.

- l'étude de l'accumulation et de la phytotoxicité des NTC sur le blé et le colza.

La présentation de ces résultats s'appuiera sur deux articles rédigés et soumis durant la thèse. Deux articles supplémentaires ont été publiés lors de cette thèse, ils sont placés en annexe de ce manuscrit.

Ces travaux de thèse ont été financés par le CEA et l'ADEME et ont été réalisés dans le cadre du consortium international sur les implications environnementales des nanotechnologies (iCEINT) ainsi que dans celui du C'Nano Ile-de-France.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 11

1. Les nanomatériaux 13
   1.1. Apparition et développement des nanotechnologies 13
   1.2. Définitions 16
   1.3. Propriétés des nanomatériaux 17
   1.4. Production des nanomatériaux 18
   1.5. Impact des nanomatériaux 20
   1.6. Nanomatériaux utilisés pour cette étude 21
      1.6.2. Les nanotubes de carbone 23
2. Impact environnemental des nanomatériaux 25
   2.1. Dissémination dans l'environnement 26
   2.2. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème eau 28
   2.3. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème sol 38
   2.4. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème air 42
3. Impact des nanomatériaux sur les végétaux 44
   3.1. Effets positifs des nanomatériaux sur les végétaux 45
   3.2. Effets délétères des nanomatériaux sur les végétaux 46
   3.3. Accumulation des nanomatériaux dans les végétaux 48
   3.4. Utilisation des nanomatériaux en biotechnologie 50
4. Synthèse du chapitre 51

1. Les nanomatériaux

1.1. Apparition et développement des nanotechnologies

« Les nanotechnologies reposent sur la connaissance et la maîtrise de l'infiniment petit. Elles constituent un champ de recherche et de développement multidisciplinaire impliquant la fabrication de nouveaux matériaux et de nouveaux dispositifs à partir d'outils ou de techniques permettant de structurer la matière au niveau atomique, moléculaire ou supramoléculaire. Les échelles caractéristiques des nanotechnologies vont de 1 à 100 nanomètres. Les nanotechnologies sont la formalisation des concepts et des procédés issus des nanosciences (sciences qui visent à comprendre les propriétés de la matière à l'échelle nanométrique) en vue de multiples applications » (www.inrs.fr).

Les concepts associés aux nanotechnologies ont été proposés pour la première fois en 1959 par le physicien Richard Feynman quand il évoquait l'infiniment petit. Ce dernier explorait la possibilité d'examiner et de manipuler les matériaux à l'échelle nanométrique, imaginant l'ensemble de *l'Encyclopaedia Britannica* écrit sur la tête d'une épingle. Cependant, le terme nanotechnologie ne fut utilisé pour la première fois qu'en 1974 lorsque Norio Taniguchi, un chercheur de l'Université de Tokyo, l'employa pour décrire la capacité de fabriquer des matériaux à l'échelle nanométrique.

Depuis, les nanotechnologies représentent un secteur en pleine expansion puisque l'US National Science Foundation (www.nsf.gov/nano) estime que l'impact économique des nanotechnologies à travers le monde se chiffrera à plus de mille milliards de dollars d'ici 2015, et générera plus de 2 millions d'emplois. Les économistes considèrent que les nanotechnologies pourraient représenter une nouvelle révolution industrielle. La production de nanomatériaux devrait ainsi connaître une croissance exponentielle dans les prochaines années. Ils touchent déjà de très nombreux secteurs : la production d'énergie, l'électronique, la médecine, l'agro-alimentaire, l'aéronautique, l'automobile, la construction ou encore la cosmétique (Tableau 1).

Tableau 1 : Secteurs utilisant des nanomatériaux [www.inrs.fr]

Applications utilisant les nanotechnologies, par secteur d'activité	
Secteur d'activité	Exemples d'applications actuelles et envisagées
Automobile, aéronautique et espace	matériaux renforcés et plus légers ; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, antirayures, anticorrosion et antisalissures ; capteurs optimisant les performances des moteurs ; détecteurs de glace sur les ailes d'avion ; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion ; pneumatiques plus durables et recyclables
Electronique et communications	mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés ; cellules solaires ; bibliothèques électroniques de poche ; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides ; technologies sans fil ; écrans plats
Chimie et matériaux	pigments ; poudres céramiques ; inhibiteurs de corrosion ; catalyseurs multi-fonctionnels ; vitres antisalissures et autonettoyantes ; textiles et revêtements antibactériens et ultrarésistants ; membranes pour la séparation des matériaux (traitement de l'eau) ; couches ou multicouches

	fonctionnelles : isolation thermique
Pharmacie, biomédical et biotechnologie	médicaments et agents actifs ; surfaces adhésives médicales anti-allergènes ; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis ; surfaces bio-compatibles pour implants ; vaccins oraux ; régénération des os et des tissus ; kits d'autodiagnostic
Cosmétique	crèmes solaires transparentes ; pâtes à dentifrice plus abrasives ; maquillage et notamment rouge à lèvres avec une meilleure tenue
Santé	appareils et moyens de diagnostic miniaturisés et nanodétection ; tissus et implants munis de revêtements améliorant la bioactivité et la biocompatibilité ; capteurs multi-fonctionnels ; analyses d'ADN ; membranes pour dialyse ; destruction de tumeurs par chauffage ; thérapie génique : nanovecteurs pour transfert de gènes ; microchirurgie et médecine réparatrice : nano-implants et prothèses
Energie	cellules photovoltaïques nouvelle génération ; nouveaux types de batteries ; fenêtres intelligentes ; matériaux isolants plus efficaces ; photosynthèse artificielle (énergie « verte ») ; entreposage d'hydrogène combustible
Environnement et écologie	diminution des émissions de dioxyde de carbone ; production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer ; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables ; couches non toxiques fonctionnelles de capteurs pour la dépollution environnementale ; récupération et recyclage des ressources existantes ; analyseurs chimiques spécifiques
Défense	détecteurs et correcteurs d'agents chimiques et biologiques ; systèmes de surveillance miniaturisés ; systèmes de guidage plus précis ; textiles légers et qui se réparent d'eux-mêmes
Secteur manufacturier	ingénierie de précision pour la production de nouvelles générations de microscopes et d'instruments de mesure et de nouveaux outils pour manipuler la matière au niveau atomique

Un inventaire des produits commerciaux dérivés des nanotechnologies, accessible au grand public via Internet, est mis en ligne par le Woodrow Wilson International Center for Scholars et le Pew Charitable Trusts, en partenariat avec des chercheurs, des décideurs publics, des industriels et des ONG (www.nanotechproject.org). L'inventaire est basé sur les déclarations volontaires des fabricants. Ainsi, la quantité de produits de consommation courante incluant officiellement des nanomatériaux est passée de 54 en 2005 à 1317 en 2011 soit une augmentation de près de 2500% (Figure 1A). Néanmoins, on peut raisonnablement penser que de nombreux autres produits en contiennent également sans le mentionner. Sur ces 1317 produits, 30 sont recensés en France. On trouve des raquettes de tennis, des fers à lisser et des cosmétiques. Le premier marché mondial se trouve aux Etats-Unis avec 45% des nanoproduits enregistrés. Aujourd'hui, une trentaine de pays dans le monde commercialisent des produits contenant des nanomatériaux (Figure 1B).
Les principaux secteurs concernés sont celui de la santé et du bien-être, suivi par celui des produits domestiques (Figure 1C).

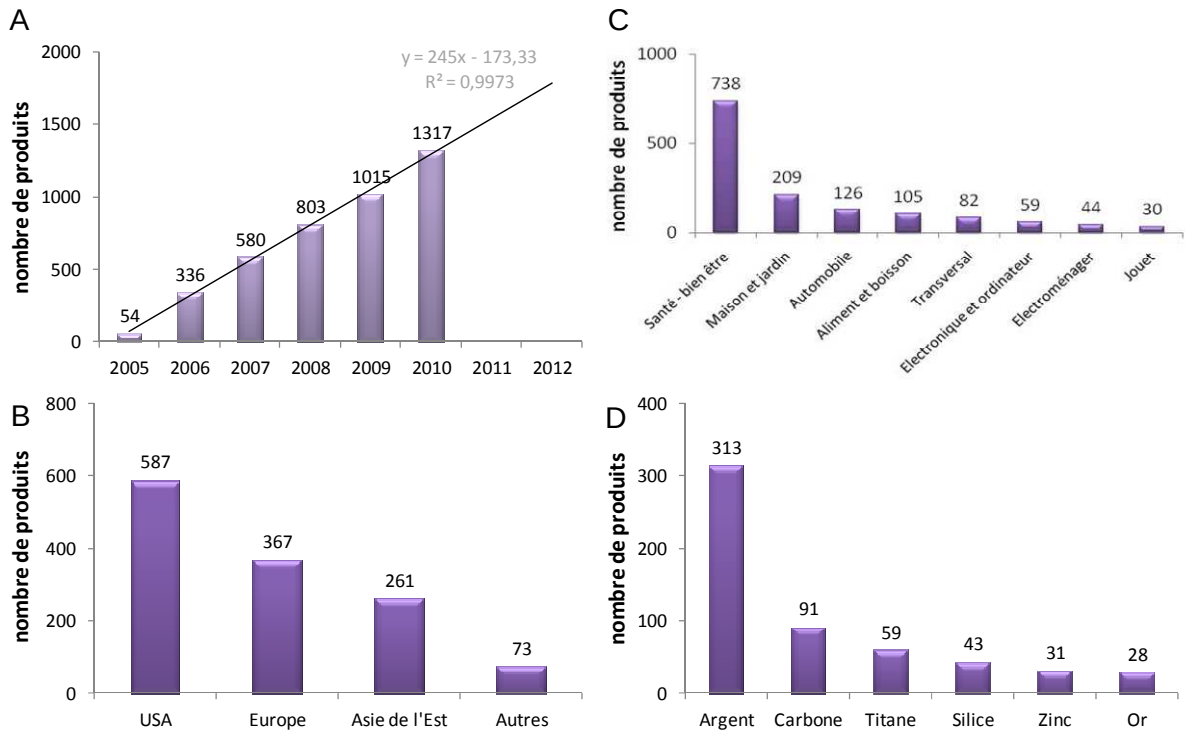


Figure 1 : Marché des produits de consommation courante contenant des nanomatériaux (chiffres mars 2011). A. Nombre de produits. B. Pays dans lesquels sont commercialisés ces produits. C. Répartition de ces produits selon les catégories de consommation. D. Nanomatériaux inclus dans ces produits [www.nanotechproject.org]

Parmi les types de produits les plus cités, on trouve les vêtements, les accessoires sportifs, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle. On recense également des jouets, des appareils électroniques et informatiques, des matériaux de construction et d'ameublement (Figure 2).



Figure 2 : Exemples de produits contenant des nanomatériaux [www.nanotechproject.org]

Les nanomatériaux les plus couramment utilisés sont, dans l'ordre décroissant, (Figure 1D) : l'argent (Ag), le carbone (essentiellement nanotubes et fullerènes), le titane (dont le dioxyde de titane), le silicium et le zinc (dont l'oxyde de zinc).

Aujourd'hui, plus de 10 millions de tonnes de NPs sont produites dans le monde chaque année (AFSSET, 2010).

On retrouve également les nanomatériaux dans l'industrie agro-alimentaire : au moins 104 produits agricoles et alimentaires contenant des nanomatériaux, ou fabriqués par nanotechnologie, sont d'ores et déjà en vente actuellement dans l'Union Européenne (Friends of the Earth, 2008). Plusieurs centaines de ces produits seraient également vendus dans le monde entier. Selon ce rapport, les nanotechnologies seraient utilisées pour la fabrication de compléments nutritionnels, de films plastiques alimentaires, d'emballages, de récipients, d'outils de cuisine antibactériens mais aussi pour la transformation de la viande. Il existe un autre rapport concernant l'utilisation de nanomatériaux en cosmétologie. On recenserait des centaines de crèmes solaires, produits cosmétiques et soins corporels contenant des NPs ayant été mis sur le marché (Friends of the earth, 2006).

Le développement rapide des nanotechnologies est stimulé par des investissements importants dans la recherche dans un contexte international très compétitif. Dans le cadre de son 6ème programme-cadre de recherche (2003-2006), l'Union Européenne a investi 1,4 milliard d'euros à travers 550 projets dans le domaine des nanosciences. Sur la durée du 7ème programme (2007-2013), le financement de la Commission Européenne pour les nanotechnologies (identifiées comme axe de recherche prioritaire) a fortement augmenté et le financement moyen atteint 3,5 milliards d'euros. En parallèle, le nombre de publications par an sur le sujet des nanotechnologies est passé de 10.000 en 1996 à 41.000 en 2006, tous domaines confondus. Le nombre de brevets, quant à lui, est passé de 342 en 1996 à 1838 en 2006 (www.nanowerk.com). Enfin, le nombre d'entreprises travaillant dans les nanotechnologies a atteint plus de 6000 en 2006 dont 48% aux Etats-Unis, 30% en Europe et 20% en Asie (www.nanodistrict.org).

1.2. Définitions

Les nano-objets ont été définis par la norme ISO TS 27687 (Nanotechnologies – Terminologie et définitions relatives aux nano-objets – nanoparticule, nanofibre et nanoplat), publiée à la fin du mois de septembre 2008. Plus récemment (18/10/2011), les nanomatériaux ont été définis comme suit par la Communauté Européenne :

- un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé,
- contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat,
- dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

De plus, on distingue les NPs qui comprennent leurs trois dimensions dans le domaine nanométrique, les nano-plaques qui n'ont qu'une dimension nanométrique et les nanofibres qui sont des nanomatériaux présentant deux dimensions nanométriques, la troisième dimension étant plus longue de façon significative.

On parle souvent de NPs au sens large, c'est-à-dire en y incluant les nanomatériaux de type nanotubes.

Pour resituer le domaine nanométrique (Figure 3), l'ADN mesure 2,5 nm, un globule rouge 7000 nm et l'épaisseur d'un cheveu atteint 80 000 nm (OMS, 2008).

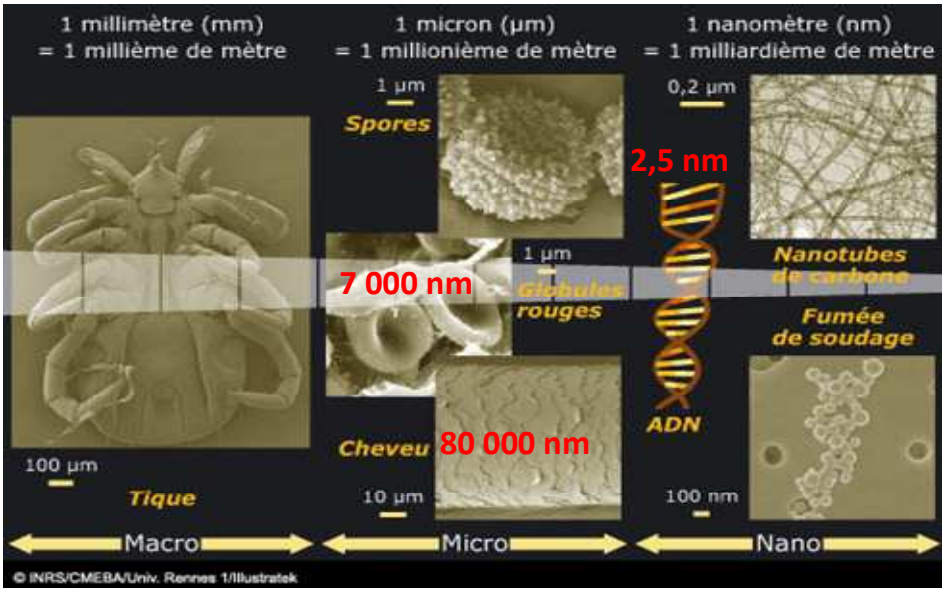


Figure 3 : Echelle du vivant [www.inrs.fr/dossiers/nanomateriaux.html]

On peut classer les NPs en deux catégories selon leurs origines : les NPs manufacturées, c'est-à-dire produites intentionnellement, et les autres NPs dites « accidentelles » qui peuvent, elles-mêmes, avoir deux sources : soit anthropogénique, elles sont alors des coproduits de procédés industriels ; soit naturelle, elles sont produites lors de feux de forêt ou d'éruptions volcaniques par exemple. Ces dernières particules existent depuis toujours et sont appelées particules ultrafines dans le domaine d'étude de la pollution atmosphérique.

1.3. Propriétés des nanomatériaux

La très petite taille des nanomatériaux entraine l'apparition de nouvelles propriétés inconnues sur le même matériau de taille micrométrique ou supérieure. En effet, à partir d'une certaine taille les propriétés des matériaux sont régies par les **effets quantiques,** d'où ce changement de comportement. Lorsque la taille des particules diminue, le nombre de particules par unité de masse augmente considérablement : ce nombre est multiplié par 1.000.000 lorsque le diamètre passe de 100 à 1 nm. En parallèle, la surface de contact entre particules et environnement est multipliée par un facteur 100. En effet, plus une particule est petite, plus la proportion de ces atomes en surface est importante. Ainsi, une particule de 30 nm possédera 5% de ses atomes en surface alors qu'une particule de 4 nm en aura environ 50%. Cela signifie également que plus une particule est petite, plus sa réactivité de surface est élevée (Figure 4) (Auffan *et al.*, 2009).

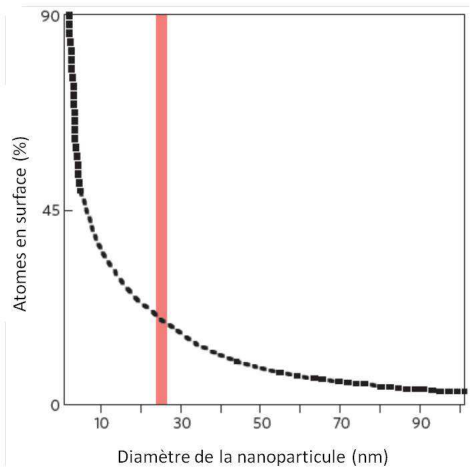


Figure 4 : Illustration de la proportion d'atomes en surface de la NP en fonction de son diamètre [Auffan et al., 2009]

En plus d'une réactivité accrue, d'autres propriétés peuvent apparaitre à cette échelle, absentes à l'échelle micro ou macroscopique : conductivité électrique, élasticité, solidité accrues ou encore changement de couleur. Ainsi, par exemple, sous forme de graphite (mine de crayon), le carbone est tendre et malléable alors qu'à l'échelle nanométrique, il est plus solide que l'acier et six fois plus léger. De même, l'oxyde de zinc qui est normalement blanc et opaque, devient transparent à l'échelle nanométrique (www.inrs.fr).

Néanmoins, certaines études montrent que des particules de taille supérieure à 100 nm et jusqu'à 1000 nm (Wang et al., 2006; Ashwood et al., 2007), possèdent des propriétés différentes de celles des matériaux macroscopiques. Alors que certaines autres voudraient réduire la classe des NPs aux particules de diamètre inférieur à 30 nm (Auffan *et al.*, 2009).

1.4. Production des nanomatériaux

Il existe deux procédés de fabrication pour obtenir des nanomatériaux : le procédé dit « ascendant » ou bottom-up et le procédé dit « descendant » ou top-down (Figure 5). La première méthode, principalement utilisée dans les laboratoires, consiste à construire des nanomatériaux atome par atome. Alors que la seconde, utilisée dans l'industrie, consiste à fractionner et à réduire des structures de taille plus importante jusqu'à atteindre le stade nanométrique. Cette méthode est moins précise mais permet d'obtenir de plus grandes quantités de matière.

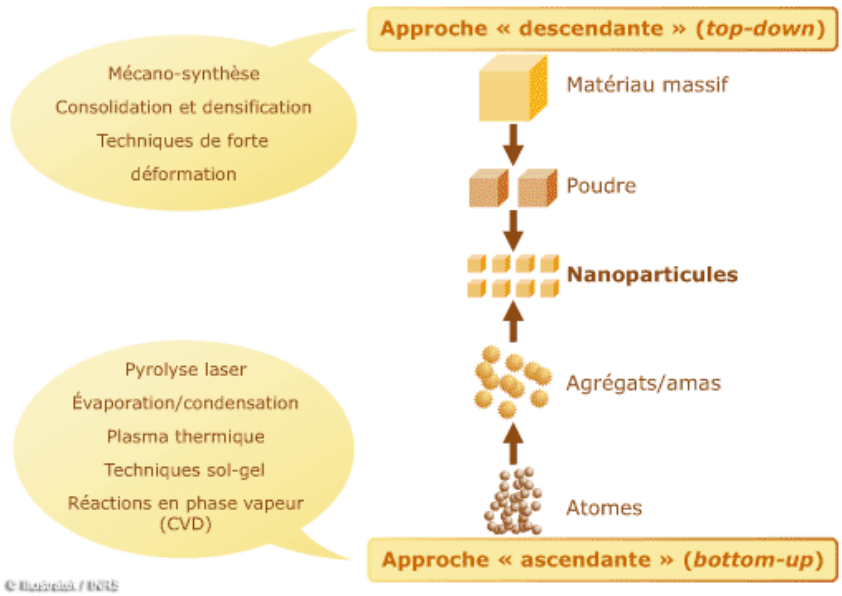


Figure 5 : Procédés d'élaboration de nanomatériaux [www.inrs.fr]

Il existe trois grandes classes de méthodes de production des nanomatériaux. Les procédés physiques et chimiques sont employés dans l'approche bottom-up. Les procédés mécaniques, quant à eux, sont caractéristiques de l'approche top-down.
Le procédé physique fait intervenir le changement d'état vapeur-liquide en phase saturée en atomes ou en ions métalliques suivi d'un refroidissement brutal (la trempe). La condensation brutale de la vapeur métastable dans un gaz inerte (généralement l'argon) favorise la germination de très petits agrégats. Ce sont les nanomatériaux. Leur taille sera fonction de la vitesse de refroidissement et de la sursaturation locale en matériaux. Cette catégorie de procédés inclut notamment la pyrolyse laser. Le procédé chimique, quant à lui, repose sur des réactions chimiques au sein du réacteur. Dans cette catégorie, on peut citer les réactions en phase vapeur (CVD). Enfin, les procédés mécaniques consistent en un broyage de poudres micrométriques jusqu'à l'obtention d'une poudre nanométrique homogène et de taille désirée.

Depuis peu de temps, la biosynthèse de nanomatériaux, c'est-à-dire la production par des bactéries ou des végétaux, est à l'étude. Ainsi, en 2007 une équipe de chercheurs a synthétisé des NPs d'un alliage d'or, de cuivre et d'argent grâce à des plants de colza cultivés sur des sols enrichis en ions Au^{3+}, Cu^{2+} et Ag^{+} (entre 40 et 50 mg/kg sol) (Haverkamp *et al.*, 2007). Cette production de nanomatériaux est aussi possible pour des plantes cultivées en hydroponie (Bali *et al.*, 2010b). Le même résultat peut être obtenu à partir de bactéries (Suresh *et al.*, 2010). Dans certains cas, il a été prouvé que des NPs d'argent obtenues à partir de *Streptomyces* possédaient des propriétés antibactériennes hors du commun, et entraînaient une diminution drastique des populations bactériennes résistantes aux antibiotiques (Shirley *et al.*, 2010). Des extraits de plantes ou de bactéries mènent également à des conclusions similaires (Sadhasivam *et al.*, 2010). La production de nanomatériaux par biosynthèse est, pour l'instant, encore limitée aux laboratoires et les mécanismes impliqués restent encore mal élucidés (Duran *et al.*, 2011).

1.5. Impact des nanomatériaux

Les propriétés particulières des nanomatériaux ont fait émerger des questionnements de la part des instances dirigeantes et des particuliers, quant à leur impact sur l'environnement et les populations.

Tableau 2 : Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux [www.inrs.fr]

Facteurs liés aux nanoparticules qui déterminent leur toxicité	
Composition chimique	La nature des nanoparticules (notamment métallique), ainsi que la présence de composés chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbés sur leur surface, sont susceptibles d'influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène.
Taille	Une diminution de la taille des particules ou des fibres favorise leur pénétration dans les cellules et leur migration dans l'organisme.
Surface	La surface spécifique d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Or, la réactivité chimique d'une particule dépend de sa surface. Ainsi, une diminution de la taille des particules et des fibres induit une augmentation de leur surface spécifique et donc une augmentation de leur réactivité chimique. De plus, la surface des nanoparticules joue un rôle fondamental dans les contacts et les interactions avec les différents tissus et cellules. Elle favorise également la pénétration de certaines substances dans l'organisme : celles-ci sont adsorbées et peuvent atteindre divers sites.
Nombre	L'augmentation du nombre favorise la pénétration des nanoparticules dans l'organisme.
Forme	La toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nanoparticules. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique. Cet effet est notable pour les particules avec une longueur supérieure à 8 µm et un diamètre inférieur à 0,25 µm, indépendamment de leur composition chimique.
Structure	La cristallinité, pour les composés minéraux (comme la silice ou le titane), peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des nanoparticules.
Solubilité	La dissolution constitue une étape critique dans la détermination du devenir des nanoparticules dans l'organisme.
Degrés d'agrégation et d'agglomération	Dans les faits, les nanoparticules individuelles existent rarement. Aussitôt formées au cours des divers procédés, elles ont une tendance naturelle à s'unir de façon irréversible pour donner naissance à des structures secondaires nommées agrégats. Sous certaines conditions, les agrégats peuvent à leur tour se lier pour former des structures tertiaires réversibles nommées agglomérats dont la taille peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nanoparticules dans l'organisme, leur pénétration dans ou à travers les cellules et leurs effets biologiques.

De plus, il a été suggéré que leurs effets dépendaient de leurs caractéristiques physico-chimiques comme leur taille, leur forme, leur structure cristalline ou encore leur composition chimique (Tableau 2).

Tous ces critères peuvent moduler les effets toxiques provoqués par les NPs. Ainsi, des matériaux qui auraient la même composition chimique mais avec des tailles ou des formes différentes produiraient également des effets différents sur les organismes. Cette grande diversité de propriétés rend difficile l'évaluation de l'impact des NPs sur la santé et sur l'environnement.

1.6. Nanomatériaux utilisés pour cette étude

Les trois nanomatériaux les plus produits au niveau mondial sont à base d'argent, de carbone et de titane. Nous avons choisi de focaliser cette étude sur les NTC et le TiO_2. Ces deux nanomatériaux diffèrent par leur nature chimique mais également par leur forme. Nous pourrons donc mettre en évidence une éventuelle influence de ces deux caractéristiques sur l'impact des nanomatériaux sur les plantes.

1.6.1. Le dioxyde de titane

Le TiO_2 est un constituant naturel des écosystèmes, cependant dans ceux-ci il est rarement à l'état nanoparticulaire. On le retrouve à hauteur de 0,5% dans la croûte terrestre et dans les sols avec l'existence de fortes disparités (www.inchem.org). Il existe sous différentes formes cristallines (anatase, rutile, brookite et ilménite). Cet arrangement particulier des atomes dans l'espace confère des propriétés spécifiques à chacune des phases. Dans les minerais, le titane et le fer se trouvent souvent associés sous forme d'oxydes mixtes.

Dans la nature, le titane est le plus souvent sous sa forme **rutile**. Cette forme correspond à un arrangement tétragonal des atomes (Figure 6A). On le trouve alors dans les roches magmatiques et métamorphiques. Il prend une couleur rouge (Figure 6B).

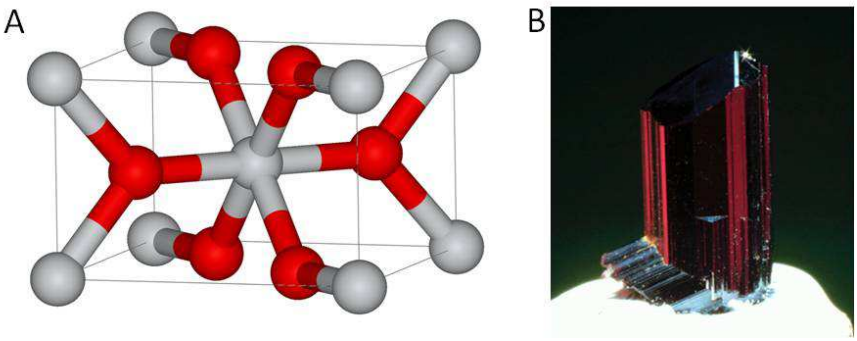


Figure 6 : Dioxyde de titane de forme cristalline rutile. A. Structure cristalline (en gris Ti^{4+}, en rouge O^{2-}). B. Aspect naturel

On trouve également dans la nature la phase **anatase**, mais beaucoup plus rarement. Il s'agit également d'un arrangement tétragonal (Figure 7A). Le TiO_2 donne alors une teinte aux roches pouvant aller de l'incolore au brun (Figure 7B).

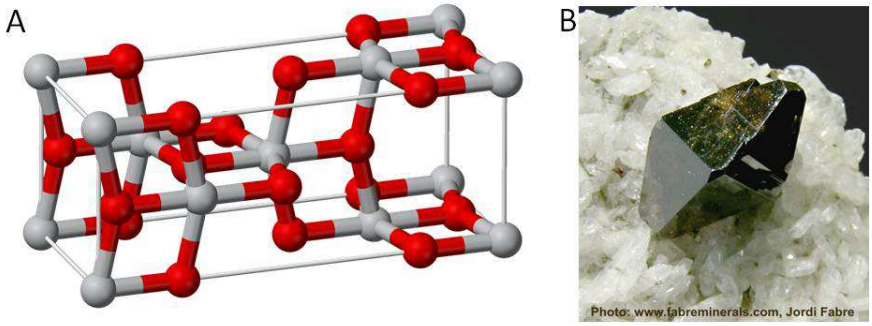


Figure 7 : Dioxyde de titane de forme cristalline anatase. A. Structure cristalline (en gris Ti^{4+}, en rouge O^{2-}). B. Aspect naturel

Dans ces deux structures, le titane est entouré de 6 atomes d'oxygène et chaque atome d'oxygène est lui-même entouré de 3 atomes de titane. A température ambiante, l'anatase se transforme lentement en rutile. A hautes températures (≈ 600°C), la transformation est rapide et complète.
On peut aussi trouver le dioxyde de titane sous forme ilménite (sous forme $FeTiO_3$) ou brookite (de structure cristalline orthorhombique).
Ces minéraux sont extraits de mines principalement australiennes et canadiennes.

Le TiO_2 est un matériau semi-conducteur qui exhibe des propriétés de photocapacité. Il permet ainsi de fabriquer des cellules photoélectriques où l'énergie lumineuse peut être convertie en électricité et stockée.

Il possède également des propriétés très intéressantes de photocatalyse (Figure 8A). La photocatalyse est une réaction dans laquelle la lumière agit sur une substance appelée catalyseur (ici le TiO_2) et en accélère la vitesse de réaction chimique. Dans ce type de réaction, le catalyseur n'est ni consommé, ni altéré. Le TiO_2 pourrait ainsi catalyser la dégradation de pesticides dans l'eau sous l'action de rayons UV. Ou encore, intégré dans un enrobé routier, il permettrait de catalyser l'oxydation de NO_2 ou NO_3 en provenance des pots d'échappement.
Sous l'influence de la lumière, le TiO_2 peut catalyser les réactions d'oxydoréduction suivantes avec l'eau ou avec le dioxygène :

$$(x1)\ TiO_2 + 4\ e^- + 4H^+ = Ti + 2\ H_2O$$
$$(x4)\ H_2O = HO° + H^+ + e^- \quad (\text{ou encore } O_2 = O_2° + H^+ + e^-)$$

$$TiO_2 + 2H_2O \longrightarrow Ti + 4\ HO° \ (\text{ou encore } TiO_2 + 4O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + Ti + 4O_2°)$$

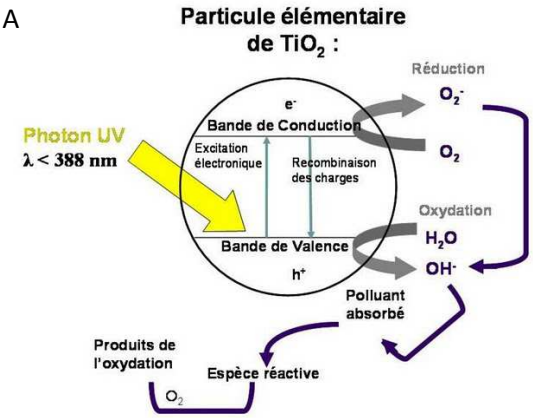
Les espèces radicalaires produites peuvent ensuite réagir par oxydoréduction avec d'autres molécules, comme des polluants atmosphériques, par exemple avec le dioxyde de soufre ou le dioxyde d'azote :

$$2\ OH° + SO_2\ (g) \longrightarrow H_2SO_4\ (aq)$$
$$OH° + NO_2\ (g) \longrightarrow HNO_3\ (aq)$$

Ces propriétés sont exacerbées lorsque le TiO_2 mis en application est nanostructuré. Ainsi, ce type de réactions confère des propriétés dites autonettoyantes aux surfaces incluant des NPs de

TiO_2. On en trouve dans les bétons, les peintures et les vitres. Les NPs de TiO_2 entrent ainsi déjà dans la construction de nombreux édifices (Figure 8B).

A



B



Figure 8 : A. Propriétés photocatalytiques du TiO_2. B. Application à la dépollution dans le cadre de l'église du Jubilé à Rome dont le béton contient des NPs de TiO_2 pour leurs vertus autonettoyantes (2007)

Malheureusement, cette production d'espèces radicalaires est aussi à l'origine de problèmes sanitaires. En effet, les espèces OH° et O_2° sont des espèces susceptibles de générer un stress oxydant si elles s'accumulent dans les cellules (animales ou végétales). Si les enzymes du système antioxydant sont incapables de réguler le stress, il y a alors endommagement des membranes, apparitions de lésions à l'ADN pouvant conduire à la mort de la cellule ou encore à l'apparition de mutations. Après révision par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le TiO_2 a été reclassé dans les cancérigènes possibles pour l'Homme dans la catégorie 2B en 2006 (produit supposé cancérigène mais pour lequel on ne dispose pas de suffisamment de données en laboratoire). Aux Etats-Unis, une législation (2005) réglemente l'exposition des travailleurs aux NPs de TiO_2 à 1 mg/m^3 (concentration moyenne pondérée pour une durée de travail de 40 h hebdomadaires).

Ainsi, le TiO_2 est un nanomatériau très prometteur surtout dans le cadre du développement durable avec ses propriétés dépolluantes mais il reste sujet à caution car ses atouts peuvent aussi représenter un danger pour la santé humaine et pour l'environnement.

Aujourd'hui, la production mondiale de NPs de TiO_2 atteint deux millions de tonnes par an (AFSSET, 2010).

1.6.2. Les nanotubes de carbone

Le carbone existe sous plusieurs formes ; les plus connues étant le diamant et le graphite (Figure 9A). Il se rencontre également à l'état nanométrique sous la forme de NPs (fullerènes) ou de nanotubes. Les NTC ont existé de tout temps. Ainsi, il y a 500.000 ans les premiers feux humains en produisaient déjà. Néanmoins, il a fallu attendre l'apparition des microscopes électroniques pour en avoir les premières observations dans les années 1950, puis dans les années 1970-80, on relate les premières synthèses. C'est finalement en 1991 que l'intérêt réel des nanotubes apparaît grâce à Sumio Iijima (Monthioux and Kuznetsov, 2006).

Les nanotubes peuvent être composés de un, deux ou plusieurs feuillets concentriques repliés sur eux-mêmes. On les note alors respectivement SWCNT (single walled carbon nanotube), DWCNT (double walled carbon nanotube) et MWCNT (multiwalled carbon nanotube). Ces feuillets de graphène sont formés d'atomes de carbone disposés en réseau hexagonal (Figure 9B-C) ainsi que de deux demi-sphères de fullerène (C_{60}) à chaque extrémité. L'enroulement des feuillets peut différer et les propriétés s'en trouvent modifiées. Les nanotubes ont un diamètre inférieur à 100 nm et une longueur de 1 à plusieurs microns.

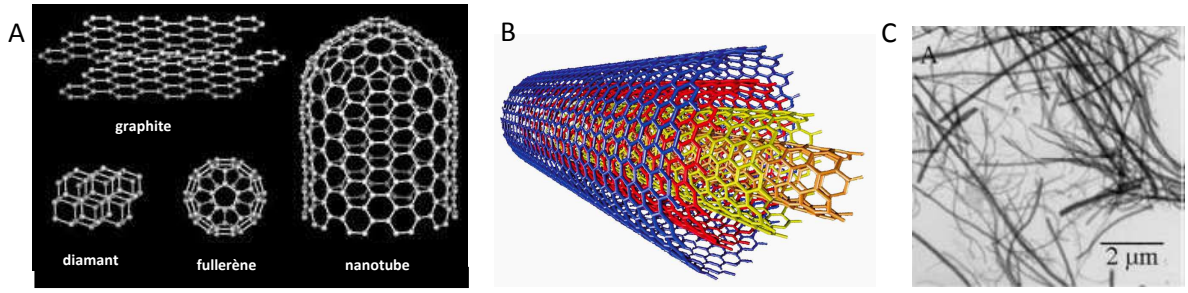


Figure 9 : A. Différentes formes de carbone [www.techno-science.net]. B. Structure d'un nanotube de carbone multi-feuillets [www.larecherche.fr]. C. Observation microscopique de nanotubes de carbone [Thèse A. Simon].

Cette structure leur confère des propriétés spécifiques. Ainsi, d'un point de vue mécanique, ils possèdent une grande force de tension et de compression, ce qui en fait un matériau à la fois solide et souple. Les NTC sont 100 fois plus résistants et 6 fois plus légers que l'acier. Ainsi, un nanotube étiré depuis la Terre jusqu'à la stratosphère (12 km de long) supporterait le poids de la planète. Les nanotubes ont également une très bonne conductivité aussi bien thermique qu'électrique. Ils constituent le matériau le plus sombre jamais employé dans l'industrie. Cette propriété pourrait intéresser les secteurs de la communication, de l'énergie solaire, de l'observation ou encore le domaine militaire. Ils pourraient aussi être à l'origine d'émetteurs d'électrons extrêmement précis et performants (construction d'écran plat). Les nanotubes développent une surface de contact importante avec l'air d'où des propriétés catalytiques intéressantes. Ils pourraient ainsi être utilisés comme vecteurs en médecine en fixant à leur surface, ou à l'intérieur du tube, différentes substances selon le but recherché.

Ils sont actuellement employés dans les équipements sportifs pour remplacer la fibre de carbone (raquette de tennis, cadre de vélo, club de golf, kayak, carrosserie de Formule 1), l'aéronautique ou encore l'automobile. On les retrouve également dans les vêtements (plus résistants et imperméables). Grâce à leur importante surface de contact avec l'air, ils peuvent aussi permettre la création de réservoirs d'hydrogène pour le stockage ou bien servir de catalyseur ou encore filtrer des polluants plus efficacement. Enfin, des chercheurs ont réussi à créer une surface adhésive du même type que celle recouvrant les pattes des lézards leur permettant de marcher sur les murs.

Néanmoins, les nanotubes, du fait de leur petite taille, peuvent facilement être absorbés par l'organisme. De plus, compte tenu de leur caractère de cycle benzénique polymérisé, ils pourraient s'intercaler entre les bases de l'ADN, générant des risques de mutation et de développement de

cancer. Enfin, ils pourraient avoir des caractéristiques similaires à celles des fibres d'amiante ayant entrainé l'un des plus grands scandales sanitaires de ces dernières années.

Ainsi, les nanomatériaux présentent de nouvelles caractéristiques très prometteuses du point de vue industriel mais soulèvent des questions en ce qui concerne leur innocuité. Face à ces questions, les différents gouvernements réagissent. Ainsi, en France, le Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (MEDD) a demandé à plusieurs instances françaises de se pencher sur les impacts possibles de ces nanomatériaux sur le plan sanitaire, social et éthique. Le Comité de la Prévention et de la Précaution (CPP) a été sollicité dès 2004 pour proposer « des moyens d'accompagner correctement la croissance des usages et des disséminations des NPs, et émettre des recommandations sur la conduite à tenir pour le suivi, l'identification de risques et l'élaboration des précautions adaptées à ces nouvelles échelles ». L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) a, quant à elle, été saisie en septembre 2005 pour que soit réalisée une synthèse des connaissances scientifiques et techniques disponibles sur cette question et proposer des pistes prioritaires pour la réalisation d'études et de recherches. Enfin, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) a également été saisie sur les risques des différents produits, relevant de sa compétence, susceptibles de contenir des NPs comme les médicaments et les produits cosmétiques.

Ces nanomatériaux, dans le cadre de leur cycle de vie, seront amenés à se disséminer dans l'environnement lors de leur production, usage, usure, destruction, recyclage ou encore lors d'éventuels accidents dans les unités de production. Il est donc important de s'intéresser à leur devenir et à leurs impacts sur les écosystèmes.

2. Impact environnemental des nanomatériaux

L'écotoxicologie est une discipline datant des années 1970 et qui a pour but de concilier l'écologie et la toxicologie à travers l'étude du comportement et des effets d'agents polluants sur les écosystèmes. Par écosystème, on entend un ensemble formé par une communauté d'êtres vivants (biocénose) et son environnement géologique, hydrologique, climatique (biotope). L'écotoxicologie permet donc d'évaluer le danger d'une substance (toxicité aiguë ou chronique) ainsi que la probabilité d'exposition. Les résultats issus de ces études permettent de mieux connaitre les substances en question et de mettre en place des plans de prévention quand cela est nécessaire.

Ainsi, les questions suivantes, entre autres, se posent :

- Quelle est la biodisponibilité des nanomatériaux dans l'environnement ?
- Est-ce que les nanomatériaux sont toxiques pour les organismes ?
- Est-ce qu'ils pourraient entrainer un déséquilibre des chaines trophiques ?
- Existe-t-il des risques d'accumulation dans les organismes et donc de contamination de la chaine alimentaire ?

Malgré l'importance du sujet et l'urgence de ces questions, ce domaine de recherche reste encore insuffisamment développé. En effet, alors que l'on retrouve des occurrences du mot

« nanoparticule » depuis les années 90 dans la bibliographie internationale, l'association « nanoparticule + écotoxicité » n'est relevée que depuis 2006 (Figure 10A). Les publications scientifiques sont depuis passées de 4 à une cinquantaine par an entre 2006 et 2011 (Figure 10B). La recherche dans ce domaine en est donc à ses débuts.

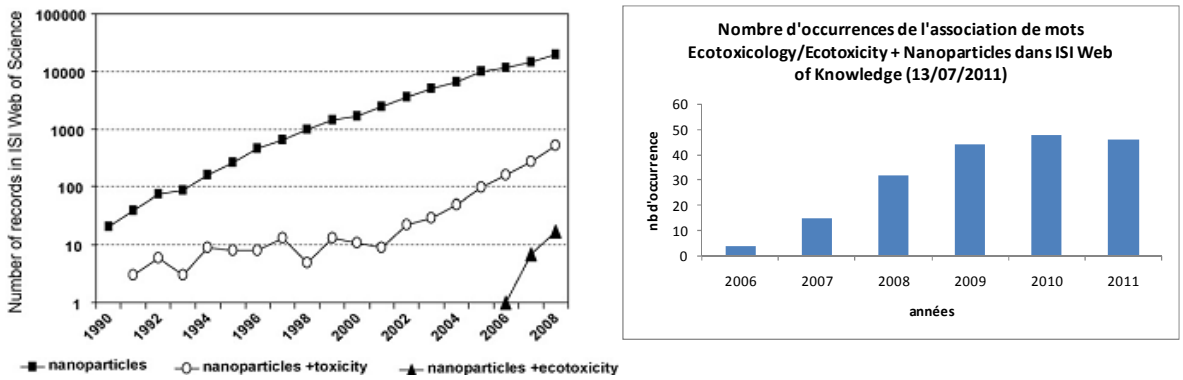


Figure 10 : A. Evolution de la discipline "ecotoxicité des nanomatériaux" par rapport à l'évolution des nanotechnologies selon le nombre de publications [Kahru and Dubourguier, 2010]. B. Evolution du nombre de publications scientifiques concernant l'écotoxicité des NPs depuis 2006

2.1. Dissémination dans l'environnement

2.1.1. Dissémination involontaire

La dissémination de nanomatériaux dans l'environnement peut se faire de différentes façons. Lorsque la dissémination est involontaire, on différencie les contaminations chroniques des contaminations aigues. La dissémination chronique consiste en une contamination par de faibles concentrations de polluants et sur des durées longues. Elle se produit lors de l'utilisation normale des nanoproduits où de faibles quantités peuvent être répandues continuellement dans l'environnement. Par exemple, des NTC peuvent être libérés dans les sols suite aux frottements des pneus sur les routes ou du TiO_2 des crèmes solaires peut se répandre dans l'eau pendant les baignades. Enfin, les NPs d'Ag entrant dans la composition des chaussettes de sport peuvent polluer les eaux suite à une lessive. A l'inverse, la contamination aigue met en jeu de fortes concentrations en polluant sur des temps courts. Ce type de contamination pourrait avoir lieu lors d'accidents dans des unités de production où de grandes quantités de nanomatériaux peuvent être émises en un même endroit.

Lors de contaminations, l'écosystème se trouve au centre des flux de polluants puisqu'il est à la fois un compartiment puits qui reçoit les contaminations mais également un compartiment source qui peut transmettre la pollution vers d'autres compartiments jusqu'à la population (Figure 11). Du fait de leur petite taille, les NPs sont susceptibles d'être très mobiles dans l'environnement et donc d'être aisément transférées d'un milieu à l'autre et vers les populations animales ou végétales.

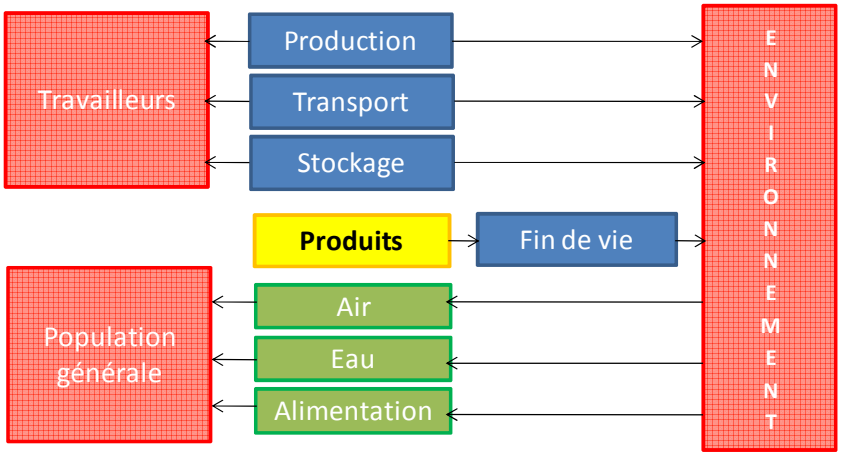


Figure 11 : Voies potentielles d'exposition aux nanomatériaux [*Adapté de AFSSET, 2010*]

Une équipe de chercheurs suisses (Mueller and Nowack, 2008; Gottschalk *et al.*, 2009) a réalisé des simulations pour estimer la quantité de nanomatériaux susceptible de s'accumuler dans l'environnement. D'après leur modélisation en 2008, le nanomatériau le plus préoccupant en termes de concentrations dans l'environnement est le TiO_2. Il s'accumulerait à hauteur de 16 µg TiO_2/L dans les eaux de surface, 4 µg TiO_2/L dans les effluents de station d'épuration et sa teneur dans les sols amendés par des boues de stations d'épuration augmenterait de 89 µg TiO_2/kg tous les ans.

2.1.2. Dissémination volontaire

La dissémination peut également être volontaire puisqu'on envisage l'utilisation de nanomatériaux dans l'industrie phytopharmaceutique pour augmenter la pénétration des substances actives dans le végétal. De plus, les nanomatériaux sont d'ores et déjà employés dans la filière de dépollution des eaux de surface et des sols (Figure 12). Les sites traités peuvent être des sites privés, des installations militaires, industrielles ou encore pétrolières et sont majoritairement situés aux Etats-Unis. Ces sites sont pour la plupart contaminés au trichloréthylène (TCE) ou au dichloroéthène (DCE) et remédiés par des NPs de fer (ZVI pour zero valent iron). Ainsi, par exemple, le sol d'un site militaire québécois a vu ses valeurs de TCE passer de 300 ppb à moins de 5 ppb après un traitement de 12 mois à l'aide de ZVI (www.nanotechproject.org).



Figure 12 : Carte des sites remédiés par des nanomatériaux [www.nanotechproject.org]

Il existe ainsi de nombreuses sources de NPs pouvant interagir avec les différents compartiments de l'environnement et perturber leurs populations (animale ou végétale). Il est donc important de connaitre le comportement de ces NPs dans l'air (agglomération, distance de transport,…), dans l'eau (agglomération, adsorption à d'autres molécules comme des polluants,…) ou encore dans les sols (adsorption aux particules du sol, biodisponibilité,…). L'étude de leurs effets sur les organismes vivants, ainsi que leur transfert trophique dans ces milieux est indissociable.

2.2. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème eau

On considère l'écosystème eau comme étant composé des eaux de surface et des espèces y étant inféodées. Une note d'actualité scientifique pour l'ANSES a été rédigée à ce sujet (Annexe 1).

2.2.1. Nanomatériaux et eaux de surface

Des nanomatériaux peuvent potentiellement être libérés dans les eaux de surface suite au lessivage de sols contaminés, par le dépôt de particules transportées par voie atmosphérique ou suite à un déversement accidentel.

Dans les eaux, la structure physique des nanomatériaux peut être modifiée. Ils peuvent ainsi subir des phénomènes de dissolution, d'agglomération ou d'adsorption qui vont modifier leur surface et donc leurs propriétés (Figure 13).

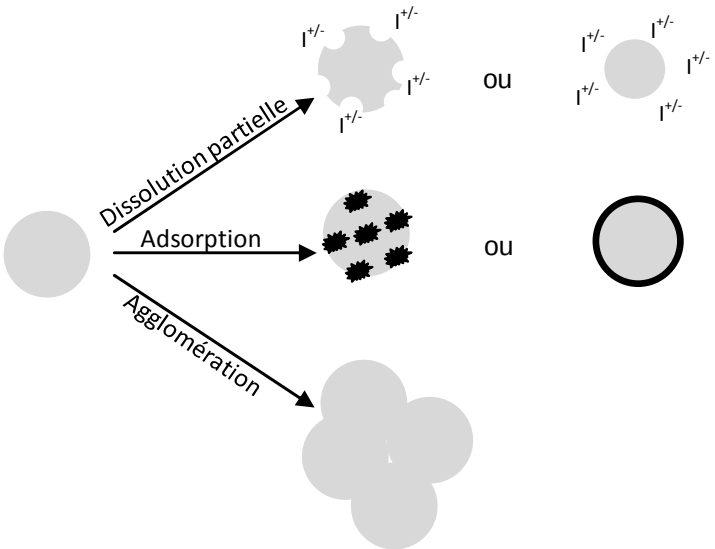


Figure 13 : Phénomènes pouvant altérer les nanomatériaux dans l'environnement

Ainsi, par exemple, des peintures à base de NPs de TiO_2 déposées sur des murs sont susceptibles de libérer plusieurs dizaines de µg de NPs par litre d'eau de lessivage sous l'effet des conditions météorologiques (Kaegi *et al.*, 2008) (Figure 14A). Ces NPs sont ainsi évacuées dans les eaux de pluie vers les stations d'épuration puis vers les eaux de surface.

Une fois dans les eaux de surface, certaines substances chimiques potentiellement toxiques (métaux lourds, HAP, divers pesticides) peuvent s'**adsorber** à leur surface et ainsi voir leur mobilité dans l'environnement modifiée.

Une étude sur les sédiments de la baie du Xiamen en Chine a montré que ces sédiments contenaient jusqu'à 2,74 g Ti/kg, en grande partie sous forme d'agglomérats de 300 nm composés de NPs d'une cinquantaine de nanomètres (Figure 14B). L'autre fraction serait composée d'agglomérats d'une taille de 300 à 700 nm et serait plutôt attribuée au titane naturel provenant de la kaolinite selon les auteurs (Luo *et al.*, 2011). De plus, la distribution du titane dans les sédiments est corrélée positivement à celle d'éléments tels que le plomb ou le zinc (Figure 14C), ce qui va dans le sens de l'adsorption de polluants à la surface des NPs. Dans ce cas, les nanomatériaux pourraient jouer le rôle de vecteur.

Dans les eaux naturelles, les nanomatériaux ont également tendance à s'**agglomérer** selon les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Slaveykova and Startchev, 2009; Bian *et al.*, 2011; Chinnapongse *et al.*, 2011; Manciulea *et al.*, 2009; Van Hoecke *et al.*, 2011). L'agglomération est possible lorsque les forces de répulsion entre les particules de même charge diminuent. Ce phénomène peut être évalué par la mesure du potentiel zeta. Plus le potentiel zeta est élevé en valeur absolue, moins les particules ont tendance à s'agglomérer. Au contraire, plus le potentiel zeta est proche de zéro, plus les particules ont tendance à s'agglomérer. Plus la force ionique de l'eau est élevée, plus les nanomatériaux ont tendance à s'agglomérer. Par exemple, plus on ajoute de NaCl au milieu plus les NPs de ZnO ont un potentiel zeta proche de zéro et donc s'agglomèrent puis sédimentent (Bian *et al.*, 2011). De même, l'ajout d'acides humiques réduit le potentiel zeta des NPs (Figure 14D). Dans un premier temps, le potentiel zeta diminue en valeur absolue et les particules sédimentent. A fortes concentrations, lorsque le potentiel zeta augmente dans les valeurs négatives, les particules sont plus stables en suspension (Bian *et al.*, 2011). Les nanomatériaux dans les eaux naturelles ont donc tendance à sédimenter et à s'accumuler dans les sédiments.

Un autre phénomène pouvant altérer les nanomatériaux est la **dissolution**. Certains nanomatériaux sont plus sujets à ce processus comme les NPs d'argent ou d'oxyde de zinc. Ainsi, 1000 mg/L de NPs de ZnO de 4 nm entraînent l'apparition de 57 mg/L d'ions Zn^{2+} (à pH 7,5). Plus la NP est petite, plus le phénomène de dissolution est important (Bian *et al.*, 2011) (Figure 14E). Les ions relargués peuvent être à l'origine d'effets toxiques supplémentaires.

Enfin, les nanomatériaux peuvent aussi être impliqués dans des réactions d'oxydo-réduction ou d'hydrolyse.

Il est également important de connaitre le niveau de **dégradabilité** des nanomatériaux pour évaluer leur persistance dans les écosystèmes. Pour l'instant, très peu de données sont disponibles à ce sujet. Néanmoins, une étude a démontré que les nanomatériaux carbonés (fullerène C_{60}, NTC simple, double et multi-parois) n'étaient pas biodégradables en milieu liquide dans l'environnement (Kummerer *et al.*, 2011).

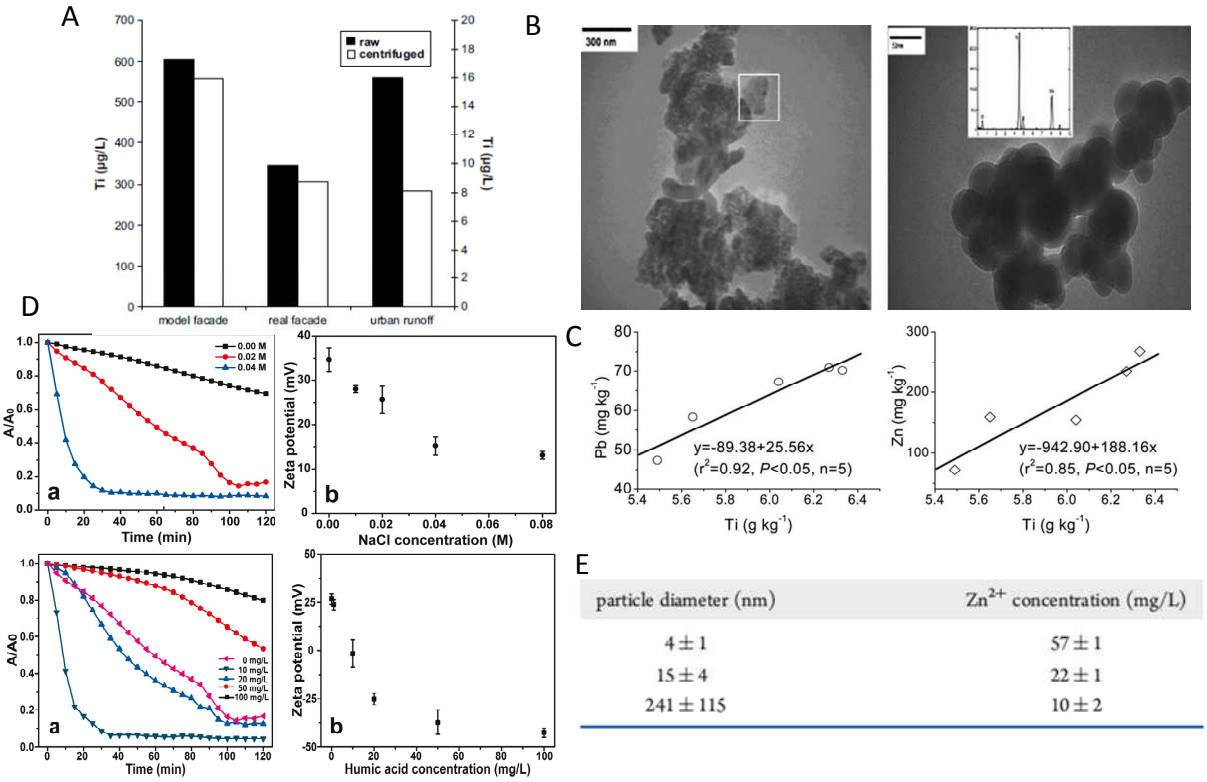


Figure 14 : A. Dosage du titane dans les eaux de lessivage directement après prélèvement ou après centrifugation (axe de gauche pour la façade modèle, axe de droite pour la façade réelle et pour les eaux de lessivage urbaines) [Kaegi et al., 2008]. B. Observations en microscopie électronique à transmission de l'aspect du titane dans les sédiments de la baie de Xiamen en Chine [Luo et al., 2011]. C. Corrélation du titane des sédiments avec le plomb et le zinc [Luo et al., 2011]. D. Influence de la force ionique et de la teneur en acides humiques sur le potentiel zeta et la sédimentation (A/A0) de NPs de ZnO [Bian et al., 2011]. E. Dissolution de 1000 mg/L de NPs de ZnO en suspension à pH 7,5 en fonction de leur diamètre nominal [Bian et al., 2011]

La contamination des eaux signifie aussi la contamination des organismes y résidant comme les bactéries, les algues, les crustacés ou encore les poissons.

2.2.2. Impact des nanomatériaux sur les bactéries de l'eau

Il a été démontré que les nanomatériaux pouvaient avoir un effet délétère sur la survie des bactéries (Chatterjee *et al.*, 2010; Dasari and Hwang, 2010; Fang *et al.*, 2010; Strigul *et al.*, 2009; Zeyons *et al.*, 2009). Par exemple, des NPs de bore et d'aluminium entrainent une diminution de la survie des bactéries *Vibrio fischeri* (Figure 15A) avec des EC_{50} comprises entre 56 et 66 mg/L alors que les NPs de TiO_2 ont très peu d'effet (Strigul *et al.*, 2009). Cette différence d'impact peut provenir de la différence de composition chimique entre les NPs ou de différences de taille. En effet, les NPs de bore et d'aluminium avaient des diamètres compris entre 10 et 100 nm. A l'inverse, les NPs de TiO_2 de 6 nm formaient des agglomérats de 0,5 à 2 mm de diamètre.

Plusieurs explications à ces effets toxiques ont été avancées. Dans certains cas, les effets seraient expliqués par la **dissolution** des nanomatériaux dans le milieu. Ainsi, les dommages morphologiques

subis par les bactéries *Nitrosomonas europaea* (Figure 15B, C) pourraient s'expliquer par la dissolution des NPs de ZnO en ions Zn^{2+} toxiques pour les organismes (Fang *et al.*, 2010).
Les effets toxiques pourraient également provenir du **contact** entre les nanomatériaux et les organismes. Ainsi, les effets toxiques de NPs de CeO_2 sont différents sur *Escherichia coli* et sur *Synechocystis* : *E. coli* est très sensible, les NPs induisent une mortalité élevée et les observations microscopiques montrent des NPs adsorbées à sa surface (Figure 15D, E). A l'inverse, les NPs n'adhèrent pas à la surface des bactéries de type *Synecosystis e*t en parallèle son développement est très peu perturbé. Cette bactérie sécrète des substances exopolymériques qui pourraient la protéger du milieu extérieur et donc des contacts avec les NPs (Zeyons *et al.*, 2009). Le contact entre nanomatériaux et organismes peut être à l'origine d'effets toxiques directs (génération d'un stress oxydant par exemple) ou d'effets indirects (diminution de la nutrition après adsorption des NPs sur les surfaces d'échanges de l'organisme).
Aucune pénétration de nanomatériaux n'a été constatée dans ces bactéries.

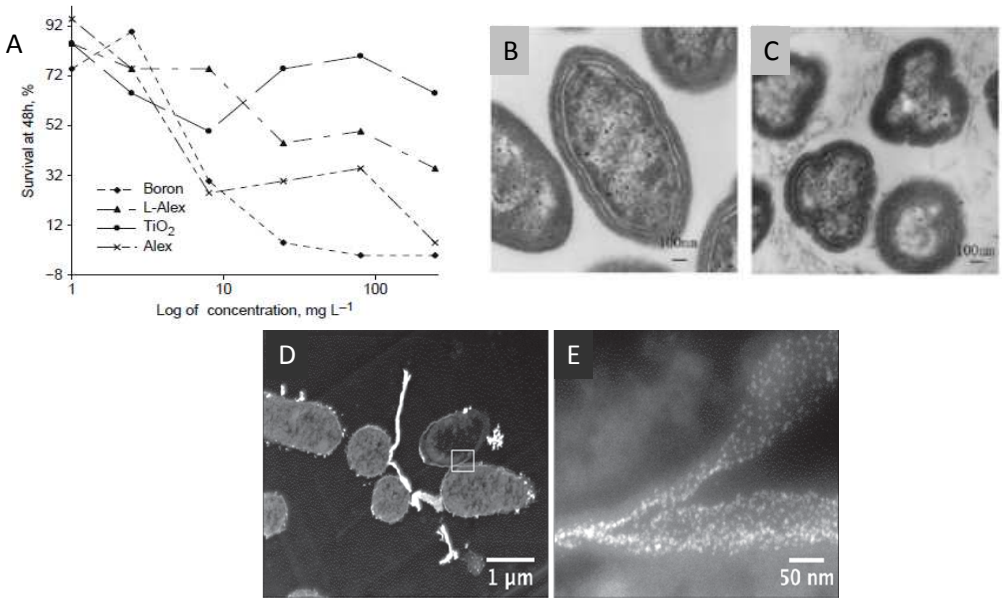


Figure 15 : A. Survie de la bactérie *Vibrio fischeri* après une exposition de 48 h à des NPs de bore, de TiO_2 et d'aluminium (brutes de synthèse: ALEX ou modifiées en surface L-ALEX) [Strigul et al., 2009]. Observation en microscopie électronique de la bactérie *Nitrosomonas europaea* (B) après exposition à 25 ppm de NPs de TiO_2 (25 nm) (C) [Fang et al., 2010]. Observation en microscopie électronique de la bactérie *E. coli* après exposition à des NPs de CeO_2 (D) et zoom de la partie encadrée en D où les NPs adsorbées à la surface de la bactérie ressortent en blanc (E) [Zeyons et al., 2009]

2.2.3. Impact des nanomatériaux sur les algues

Les algues sont, elles aussi, sensibles à une exposition aux nanomatériaux. Ces derniers entraineraient une augmentation de la mortalité (Aruoja *et al.*, 2009; Brayner *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2010), des retards de croissance (Gong *et al.*, 2011; Gubbins *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010b), une diminution de la photosynthèse (Bhattacharya *et al.*, 2010; Brayner *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009b; Shi *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010b) et une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Wei *et al.*, 2010b; Bhattacharya *et al.*, 2010).

Certains auteurs ont cherché à mettre en évidence l'influence des **caractéristiques physico-chimiques** des nanomatériaux sur leur toxicité. Ainsi, la toxicité peut varier selon les agents de synthèse (Brayner *et al.*, 2010), le diamètre nominal (Hund-Rinke and Simon, 2006), la forme (Peng *et al.*, 2011; Petit *et al.*, 2010) ou encore l'enrobage (Xu *et al.*, 2010). Selon les nanomatériaux, une partie ou la totalité des effets toxiques peuvent être attribués à la **dissolution** des nanomatériaux dans le milieu (Aruoja *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Cette dissolution est souvent accrue par les substances excrétées par les organismes (Franklin *et al.*, 2007). A l'inverse, certaines études montrent clairement que la **forme nanoparticulaire** est plus toxique que la forme ionique ou la forme micrométrique (Aruoja *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011). Par exemple, chez *Pseudokirchneriella subcapitata*, l'EC_{50} des NPs de TiO_2 est de 5,83 mg/L contre 35,9 mg/L pour la forme micrométrique (Figure 16A) (Aruoja *et al.*, 2009).

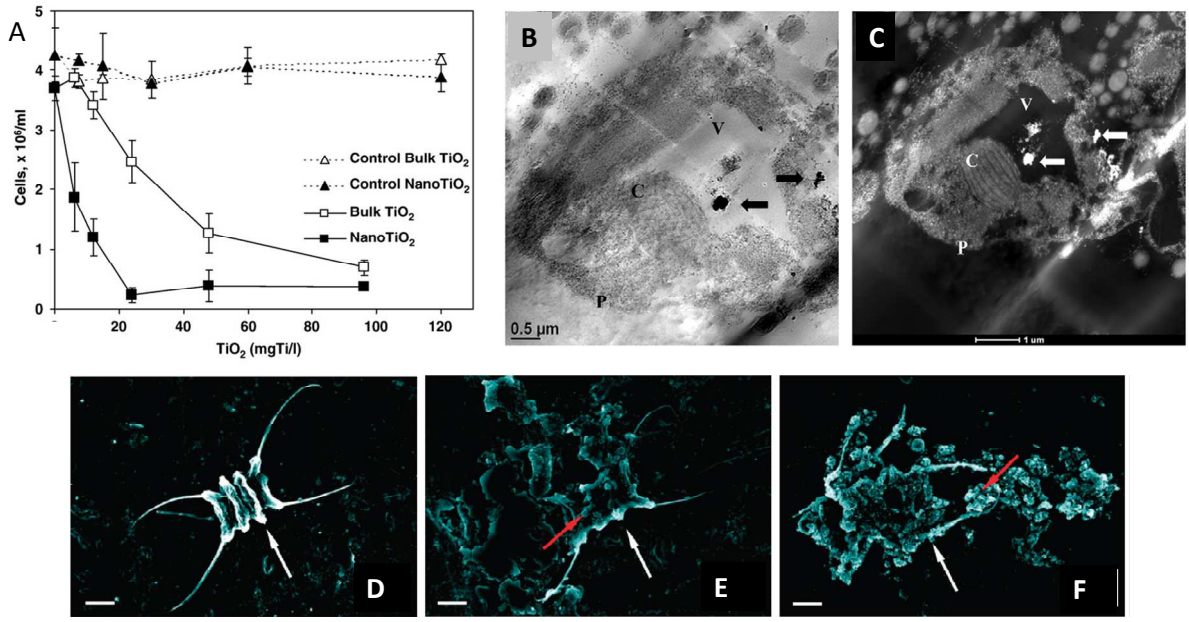


Figure 16 : A. Survie de *P. subcapitata* après exposition à du TiO_2 sous forme nanométrique (nanoTiO_2) ou micrométrique (bulk TiO_2) [Aruoja et al., 2009]. Image en microscopie électronique à transmission (B) ou en inversion de champ (C) d'*Ochromonas danica* exposée à des NPs d'Ag (*les flèches indiquent les agglomérats, p la membrane, c le chloroplaste et v la vacuole*) [Miao et al., 2010]. Aspect en microscopie de *Scenedesmus* (D) après exposition à des NPs de polystyrène chargées négativement (E) ou positivement (F) (barre d'échelle 5 µm) [Bhatthacharya et al., 2010].

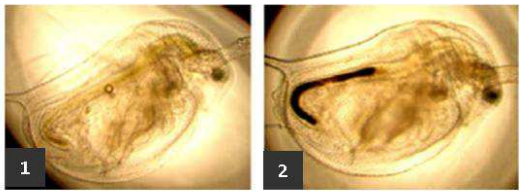
Les effets toxiques sont parfois expliqués par l'**adsorption** de nanomatériaux à la surface des algues (Aruoja *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009b; Wei *et al.*, 2010a) voire par leur **internalisation** (Figure 16B-C) (Brayner *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011). Ainsi, dans le cas de l'algue unicellulaire *Scenedesmus*, les NPs de polystyrène s'adsorbent sur toute la surface de l'algue générant des troubles de la photosynthèse (Figure 16D, E, F) (Bhattacharya *et al.*, 2010). Les substances exopolymériques pourraient également avoir un rôle protecteur. En effet, elles diminueraient les effets toxiques des nanomatériaux en limitant les contacts entre les algues et les nanomatériaux (Brayner *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010a). En comparant l'effet de NPs de ZnO sur des algues *Euglena gracilis* et *Anabaena flos-aquae*, des chercheurs ont mis en évidence une toxicité plus importante envers *E. gracilis*. A la différence d'*Anabaena*, cette algue ne sécrète pas d'exopolysaccharides qui limitent l'adsorption des

nanomatériaux à sa surface et donc leur internalisation (Brayner *et al.*, 2010). Ainsi, certaines algues sont capables de sécréter des substances pour se protéger efficacement des effets des nanomatériaux (Miao *et al.*, 2009).

2.2.4. Impact des nanomatériaux sur les crustacés

De nombreuses études ont également été menées sur l'espèce *Daphnia* qui appartient à la famille des crustacés. Ces études soulèvent des problèmes communs à toutes les études d'écotoxicologie comme la comparaison des effets entre nanomatériaux, ions et matériaux micrométriques (Blinova *et al.*, 2010; Dabrunz *et al.*, 2011; Poynton *et al.*, 2011; Wiench *et al.*, 2009; Zhao and Wang, 2010) ou bien l'influence des **caractéristiques physico-chimiques** des nanomatériaux (Wiench *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Strigul *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011) et de leur **mode de préparation** (Wiench *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010b). Les nanomatériaux induisent une augmentation de la mortalité, altèrent la reproduction, modifient le comportement ou encore génèrent des malformations chez la daphnie (Dabrunz *et al.*, 2011; Wiench *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Lovern *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010). Comme chez les bactéries ou les algues, les **effets physiques** tels que l'obstruction du tube digestif, expliquent une partie de la toxicité des nanomatériaux (Blinova *et al.*, 2010; Dabrunz *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). En effet, les daphnies ingurgitent de grandes quantités de nanomatériaux (Figure 17A) qui viennent bloquer l'assimilation des nutriments ou qui peuvent être transférées dans l'organisme (Zhao and Wang, 2010; Zhu *et al.*, 2010). De plus, des daphnies qui ingèrent des NPs de TiO_2, par exemple, ne l'éliminent pas facilement (Figure 17B) et les NPs se trouvent donc concentrées dans cet organisme (Figure 17C) (Zhu *et al.*, 2010). Cette **bioaccumulation** peut conduire à la bioamplification, c'est-à-dire à l'augmentation de la teneur en toxique d'un maillon de la chaine alimentaire à l'autre.

A



C

Dose dans milieu de culture (mg/L)	Concentration dans daphnie (g/kg MS)	Facteur de bioaccumulation (L/kg)
0,08 0,52	4,52 61, 09	56562 118063

B

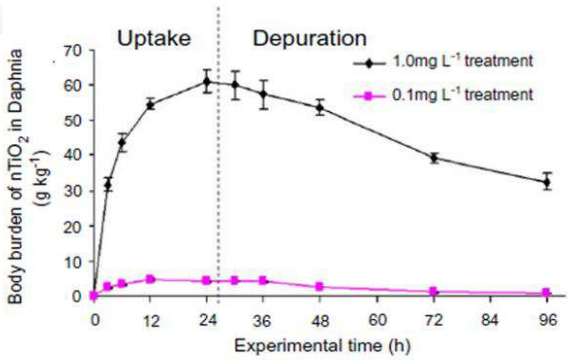


Figure 17 : A. Observation d'une daphnie (1) après exposition pendant 72h à 1 mg/L de TiO_2 (2). B. Assimilation et dépuration de NPs de TiO_2 par une daphnie. C. Phénomène de bioaccumulation des NPs de TiO_2 dans la daphnie à partir d'une contamination de son milieu [Zhu et al., 2010].

Comme pour les précédents organismes, un des mécanismes évoqués pour expliquer les effets toxiques des nanomatériaux est la génération d'un **stress oxydant** (Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Ainsi, dans les daphnies exposées à des NPs de TiO_2, l'activité des enzymes antioxydantes comme la

catalase, la glutathion peroxydase (GPX) et la glutathion-S-transferase (GST) augmente avec la concentration de NPs (Figure 18A) (Kim *et al.*, 2010).

D'autre part, des **effets génotoxiques** ont également été mis en évidence sur ce modèle biologique (Lee *et al.*, 2009; Poynton *et al.*, 2011). L'exposition de daphnies à des NPs de CeO_2 mène au fractionnement de leur ADN (Figure 18B) et en parallèle à l'augmentation de leur mortalité (Lee *et al.*, 2009).

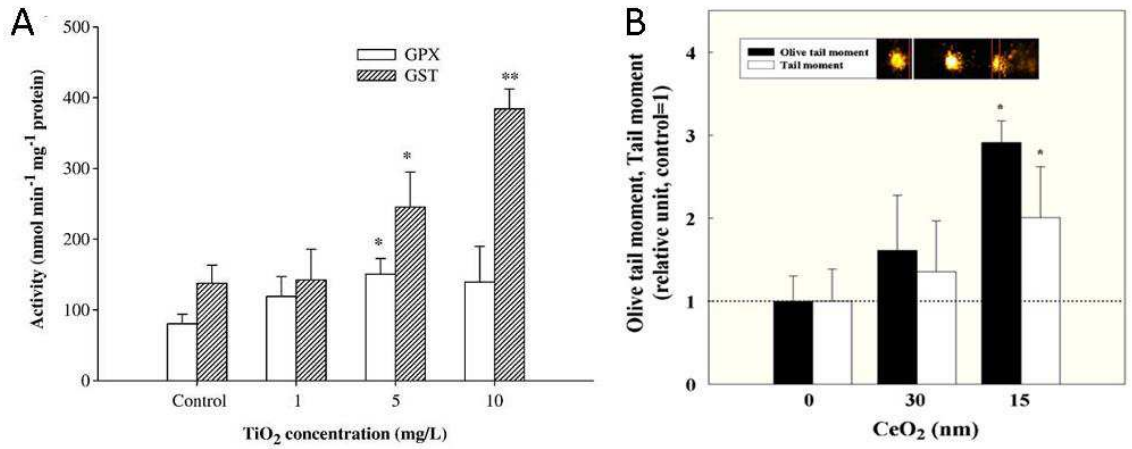


Figure 18 : A. Evaluation du stress oxydant chez la daphnie par le dosage des enzymes antioxydantes (GPX, GST) après exposition aux NPs de TiO_2 [Kim et al., 2010]. B. Evaluation des effets génotoxiques des NPs de CeO_2 envers les daphnies par le test des comètes [Lee et al., 2009]

En termes de dynamique des populations, la présence de nanomatériaux dans le milieu modifierait le bilan énergétique des organismes. Ainsi, l'assimilation et la consommation d'énergie seraient diminuées au profit de la reproduction pour maintenir la pérennité de l'espèce (Li *et al.*, 2011).

Dans ces études, il est important de garder à l'esprit que les résultats obtenus en laboratoire dans des milieux très standardisés (généralement exposition aux nanomatériaux dans de l'eau ultrapure) peuvent être très différents de ceux obtenus dans des milieux plus complexes qui se rapprochent des conditions naturelles. Un milieu plus complexe modifierait notamment les caractéristiques physico-chimiques des NPs. Par exemple, si les NPs peuvent être bien dispersées dans de l'eau ultrapure, dans une eau naturelle, elles auront tendance à s'agglomérer. Ainsi, l'ajout de kaolinite ou de carbone organique dans le milieu d'exposition des daphnies diminue la toxicité des NPs de TiO_2. L'EC_{50} passe de moins de 10 mg/L dans de l'eau ultrapure à plus de 100 mg/L en complexifiant le milieu (Hall *et al.*, 2009).

2.2.5. Impact des nanomatériaux sur les poissons

Au sommet de la chaine trophique du milieu aquatique se trouve le poisson. Le poisson subit les mêmes effets que les autres organismes après une exposition aux nanomatériaux : mortalité et perturbation du développement avec l'apparition de malformations (Asharani *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2010; George *et al.*, 2011; Laban *et al.*, 2010; Paterson *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2010; Wise *et al.*,

2010; Wu *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2011). Les phénomènes de **dissolution**, **agglomération** et **sédimentation** des nanomatériaux sont toujours évoqués comme modulateurs des effets toxiques (Bai *et al.*, 2010; Laban *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2011; Chae *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). Encore une fois, les effets notés dépendent de la **nature chimique** des nanomatériaux testés. Par exemple, les NPs d'argent entraînent des malformations très marquées sur l'embryon de poisson-zèbre alors que les effets des NPs d'or ou de platine sont peu visibles (Figure 19A) (Asharani *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). De même, alors que la plupart des études mettent en évidence les effets toxiques des NPs d'argent ou de TiO_2, une étude menée sur des NPs de silice ne relate aucun impact sur le poisson-zèbre (Fent *et al.*, 2010). L'implication du **stress oxydant** a largement été mise en évidence comme mécanisme responsable de la toxicité des nanomatériaux (George *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011; Chae *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2011). Cet effet est particulièrement bien illustré dans une étude de l'impact des NPs de TiO_2 sur des juvéniles de carpes (Hao *et al.*, 2009). Lors d'une exposition à de faibles concentrations de NPs de TiO_2 (10 et 50 mg/L), le système antioxydant est activé, en particulier l'activité de la catalase (CAT) augmente. Néanmoins, lorsque la concentration ou le temps d'exposition augmentent, le système antioxydant est inactivé et l'activité enzymatique chute (Figure 19B). L'apparition d'un stress oxydant a également été démontrée dans le cas des NPs d'argent sur le poisson-zèbre (*Danio rerio*) où les membranes sont endommagées comme l'indique l'augmentation de la concentration en malondialdéhyde (MDA) (Figure 19C).

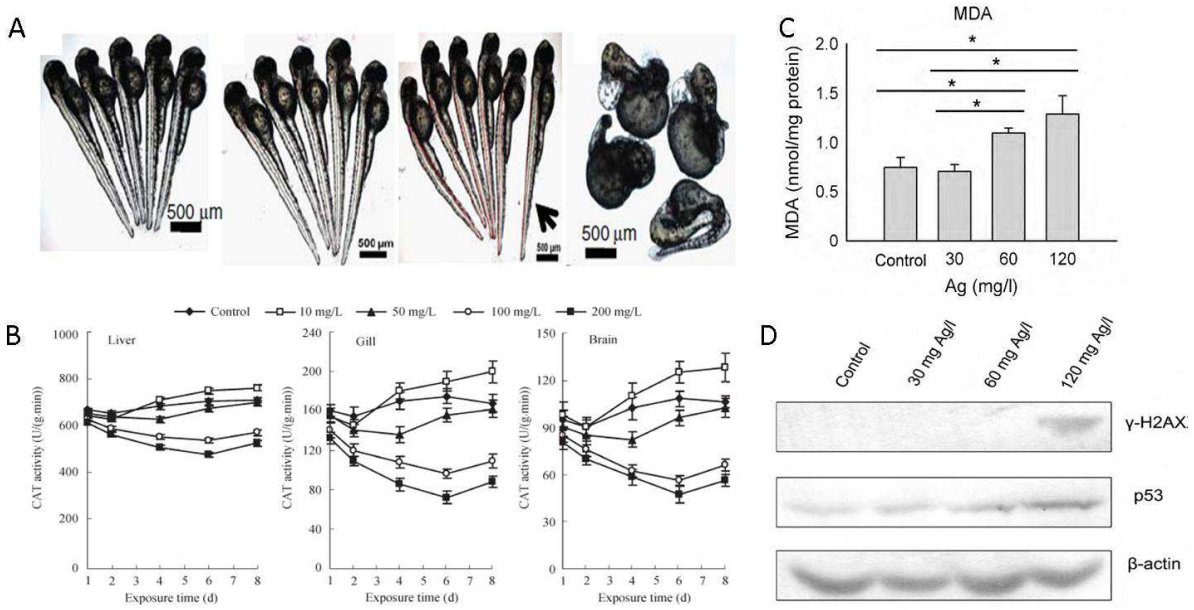


Figure 19 : A. Impact de nanomatériaux sur la morphologie de juvéniles de poisson-zèbre. De gauche à droite: témoin, NPs d'Au, NPs de Pt et NPs d'Ag [Asharani et al., 2011]. B. Activité de la catalaSE dans différents organes (foie, intestin, cerveau), enzyme de régulation du stress oxydant, après exposition de juvéniles de carpe à des NPs d'Ag [Hao et al., 2009]. C. Dosage du malondialdéhyde dans des poissons-zèbres après exposition à des NPs d'Ag [Choi et al., 2010]. D. Western blot après exposition de poissons-zèbres à des NPs d'Ag [Choi et al., 2010]

L'impact des nanomatériaux sur l'**expression des gènes** chez le poisson a fait l'objet d'études plus poussées que sur les autres espèces aquatiques (Chae *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Jovanovic *et*

al., 2011; Park *et al.*, 2010). Les chercheurs ont ainsi montré des modulations de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification des métaux ou dans la régulation du stress oxydant (Chae *et al.*, 2009). Une autre équipe a étudié la présence des protéines p53 et γ-H2AX qui sont indicatrices de l'expression de gènes impliqués respectivement dans la régulation de stress cellulaires (comme l'apoptose) et le repérage de cassures double-brins de l'ADN. Après une exposition à des NPs d'argent, ces deux protéines voient leur production augmenter en réponse au stress engendré par les NPs (Figure 19D) (Choi *et al.*, 2010).

Enfin, un autre effet des nanomatériaux a été démontré, c'est celui de **modulateur de pollution**. Les NPs, du fait de leur forte surface spécifique, sont susceptibles d'adsorber toutes sortes de polluants. Le devenir de ces polluants est alors lié à celui des NPs.

Si ces NPs sédimentent, les polluants deviennent moins biodisponibles pour les organismes et la pollution est ainsi limitée. Ainsi, les effets toxiques du 17αethinylestradiol sur le poisson-zèbre disparaissent après ajout de fullerènes (C_{60}) dans le milieu (Park *et al.*, 2010).

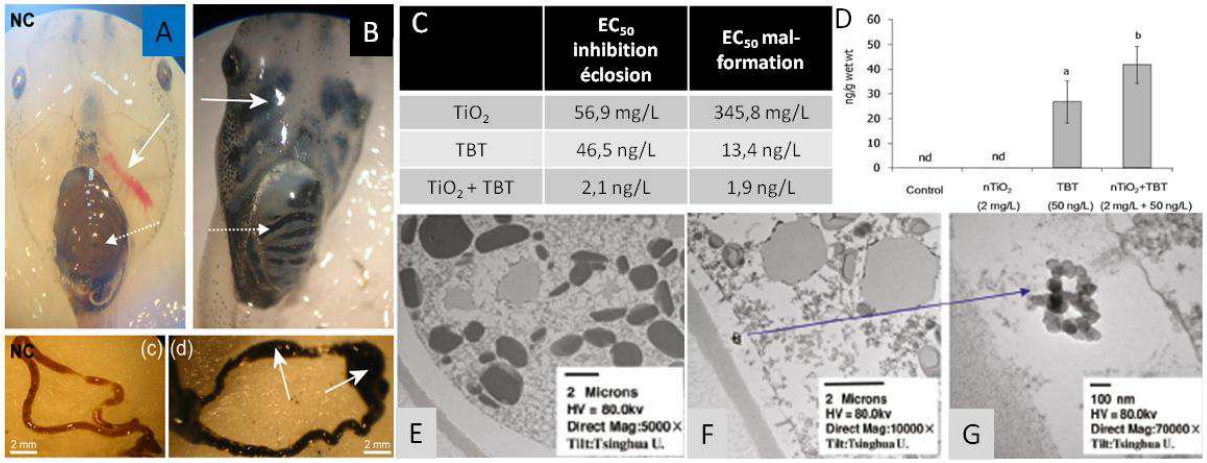
Au contraire, si elles restent en suspension, les NPs, du fait de leur petite taille et de leurs propriétés physico-chimiques, pourraient pénétrer plus facilement les membranes et parois des cellules. Elles faciliteront alors la pénétration des polluants et seront des vecteurs de la pollution. Dans le cas d'une pollution au cadmium, la présence de NPs de TiO_2 entraine une augmentation de la constante de prélèvement du cadmium du milieu par le poisson (Hu *et al.*, 2010).

2.2.6. Impact des nanomatériaux sur d'autres organismes aquatiques

Plusieurs études relatent les effets toxiques des nanomatériaux sur la moule (*Mytilus*) (Canesi *et al.*, 2008; Canesi *et al.*, 2010a; Canesi *et al.*, 2010b; Tedesco *et al.*, 2010). Des chercheurs ont démontré sur cet organisme que les nanomatériaux pourraient pénétrer par la glande digestive et à partir de là, provoquer des dégâts dans tout l'organisme tels que l'induction de processus inflammatoires (Canesi *et al.*, 2008) ou l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de stress (Canesi *et al.*, 2010a) ou encore l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et de la peroxydation lipidique (Canesi *et al.*, 2010b; Tedesco *et al.*, 2010). L'impact de NPs sur les escargots d'eau douce (Croteau *et al.*, 2011; Musee *et al.*, 2010), sur les larves de chironomes (Oberholster *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009), sur les cnidaires (Yeo and Kang, 2010) et sur les polychètes (Galloway *et al.*, 2010) a également été étudié mettant en évidence des effets toxiques à travers une diminution de la nutrition et une augmentation du nombre de malformations, du stress oxydant, des dommages à l'ADN corrélés à une augmentation de la mortalité.

Les amphibiens qui partagent leur vie entre milieu aquatique et terrestre ont également fait l'objet de quelques études. Les NPs de diamant provoquent des effets toxiques selon la fonctionnalisation de leur surface (Marcon *et al.*, 2010). A l'inverse, les NTC double-parois n'ont que peu d'effets sur la viabilité de deux amphibiens. En effet, les effets constatés sont liés à l'accumulation de nanotubes dans l'intestin des animaux (Figure 20A, B) qui limitent leur nutrition. En revanche, ils ne causent pas de dommages à l'ADN (Mouchet *et al.*, 2007; Mouchet *et al.*, 2008).

Enfin, une équipe de chercheurs a mis en évidence l'effet **vecteur de pollution** des NPs de TiO_2 sur l'ormeau. Les NPs de TiO_2 (2 mg/L) génèrent peu d'effets toxiques sur les ormeaux. En revanche, le tributyltin (TBT), un biocide bien connu, provoquent des effets toxiques chez cet organisme. Les EC_{50} déterminées lors d'une exposition au TBT se trouvent divisées par 20 lorsque des NPs de TiO_2 se trouvent également dans le milieu (Figure 20C). En parallèle, l'accumulation de cette molécule est également accrue en présence de NPs de TiO_2 (Figure 20D). De plus, ces NPs de TiO_2 sont accumulées dans l'embryon (Figure 20E, F, G). Tous ces éléments illustrent le rôle de vecteur de pollution que peuvent jouer les nanomatériaux lorsque des agents chimiques s'adsorbent à leur surface.



	EC_{50} inhibition éclosion	EC_{50} mal-formation
TiO_2	56,9 mg/L	345,8 mg/L
TBT	46,5 ng/L	13,4 ng/L
TiO_2 + TBT	2,1 ng/L	1,9 ng/L

Figure 20 : Larves de Xénope non exposée (A) ou exposée à des nanotubes de carbone (B), où ils s'accumulent dans les branchies et dans l'intestin [Mouchet et al., 2008]. C. Mise en évidence de l'effet vecteur des NPs de TiO_2 en synergie avec du tributyltin sur des embryons d'ormeaux : Mesure des EC_{50} [Zhu et al., 2011]. D. Dosage du TBT dans l'organisme après exposition avec ou sans NPs [Zhu et al., 2011]. Observations au MET d'un embryon témoin (E) ou d'un embryon exposé (F, G) à des NPs de TiO_2.

2.2.7. Impact des nanomatériaux sur une chaine trophique aquatique simplifiée

Les études tendent de plus en plus à se complexifier pour se rapprocher des conditions environnementales et à intégrer plus d'organismes pour recréer un écosystème.

Dans ce cadre, une étude a été réalisée sur un mésocosme aquatique (Figure 21A) dans lequel des NPs d'or ont été disséminées dans de l'eau de mer. Après 12 jours, l'or est dosé dans les différents éléments du mésocosme. Il est majoritairement retrouvé dans le biofilm et les palourdes (Figure 21B) (Ferry *et al.*, 2009). Ainsi, une contamination aux NPs dans un écosystème n'épargne aucun maillon et chaque maillon peut ensuite contribuer à contaminer un niveau supérieur de la chaine trophique.

A



B

	Biomasse (g)	% Au ds chaque phase
Eau de mer	$3,66 \times 10^5$	8,61
Sédiments	$4,91 \times 10^4$	24,5
Biofilm	$1,01 \times 10^3$	61,0
Herbier	$1,5 \times 10^3$	0,1
Palourdes	10	5,8
Escargots	5,5	0,05
Crevettes	15,6	0,03
Poissons	22,5	0,31

Figure 21 : A. Photo des mésocosmes aquatiques [Ferry et al., 2009]. B. Dosage de l'or dans les différentes composantes du mésocosme [Ferry et al., 2009]

2.3. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème sol

On considère l'écosystème sol comme étant composé du sol et des espèces y étant inféodées. Une note d'actualité scientifique pour l'ANSES a été rédigée à ce sujet (Annexe 2).

Lors du cycle de vie des nanoproduits, des NPs peuvent être libérées dans l'environnement et notamment dans les sols. Le sol est le milieu de vie de nombreux organismes végétaux et animaux. Il se situe également à l'interface avec les aquifères. Ainsi, de grandes problématiques telles que la mobilité des nanomatériaux dans les sols ou au contraire leur rétention, leur solubilité et leur biodisponibilité sont en cours d'investigation ainsi que leurs effets sur la faune terrestre.

2.3.1. Nanomatériaux et sols

Plusieurs études montrent que la **texture des sols** a une influence primordiale sur le comportement des nanomatériaux (Fang *et al.*, 2009; Cornelis *et al.*, 2010; Cornelis *et al.*, 2011). Une équipe de chercheurs a déterminé les K_r des NPs d'Ag et les K_d des autres formes à base d'argent (ions, particules de taille micrométrique) dans différents sols. Ce coefficient représente le fractionnement entre la phase solide et la phase liquide selon :

$$K_d = M_{solide} \times [M]^{-1} \quad (L.kg^{-1})$$

avec M_{solide}, la concentration de l'élément dans le sol ($mg.kg^{-1}$ sol) et [M], la concentration de l'élément en solution ($mg.L^{-1}$)

Ainsi, plus le K_d est élevé, plus l'élément est retenu dans le sol. Pour les NPs, un autre coefficient de fractionnement a été élaboré sur le même principe mais prenant en compte les phénomènes de dissolution propres aux NPs (K_r).

Le K_r des NPs dans un sol contenant 99% de sable et 1% d'argile est de 77 L/kg. Lorsque le ratio sable/argile passe à 75/14 (le reste étant du limon), le Kr est de 541 et enfin à 27/59, il augmente jusqu'à 2165. En comparaison, les microparticules sont beaucoup plus retenues dans les sols (K_d allant jusqu'à 33.559.688 L/kg) (Cornelis *et al.*, 2010). Dans une autre étude, les chercheurs se sont intéressés plus spécifiquement à la mobilité des nanomatériaux dans les sols. La rétention et la mobilité sont liées et les mêmes tendances ont été mises en évidence : plus le sol est argileux, moins

les NPs sont mobiles (Figure 22A). Les auteurs ont calculé des distances parcourues par les NPs de TiO_2 dans les sols allant jusqu'à 370 cm (Fang *et al.*, 2009).

Les NTC, du fait de leurs dimensions plus importantes et de leur forme, ont fait l'objet d'études supplémentaires concernant leur filtration par les particules du sol. Néanmoins, deux études sur le sujet sont arrivées à des conclusions contradictoires. Pour les uns, il y a effectivement filtration mécanique des NTC simple paroi dans les sols (Jaisi and Elimelech, 2009) aboutissant à une très faible mobilité des NTC. Pour les autres, les nanotubes s'orientent selon le flux hydrique et ne sont pas retenus d'où une grande mobilité (Tian *et al.*, 2011). Néanmoins, les sols des deux études étaient différents : dans la première, il s'agissait d'un sol naturel avec une teneur en argile de 30% alors que dans la seconde, il s'agissait d'un sable (100%), ce qui pourrait expliquer les différences de comportement constatées.

Le deuxième paramètre influençant la mobilité des nanomatériaux est la composition de la **solution du sol** et notamment sa force ionique. Plus la force ionique de la solution du sol est élevée, plus les NPs sont retenues (Figure 22B) (Chen *et al.*, 2010a; Fang *et al.*, 2009; Jaisi and Elimelech, 2009; Jiang *et al.*, 2010). En effet, plus la force ionique augmente, plus les NPs ont tendance à s'agglomérer. Les agglomérats sont moins mobiles que les NPs isolées. L'impact des cations divalents sur la rétention est plus important que celui des cations monovalents (Figure 22C). Les cations divalents étant plus fortement chargés, ils interagissent davantage avec les NPs.

La teneur en carbone organique dissous, le pH (Chen *et al.*, 2010a; Yang *et al.*, 2009) ou encore le potentiel zeta (Figure 22D) sont autant de paramètres influençant la mobilité des nanomatériaux (Fang *et al.*, 2009).

A

Sol	Argile (<2µm) %	Limon (2-20 µm) %	Sable (20-2000 µm) %	Transporté (%)	Distance max (cm)
BJ	19	48	33	83	370
HLJ	13	30	57	46	98
JX	32	47	20	0,2	11
AH	32	59	9	2,3	18
SX	46	24	31	1,3	16
CD	20	48	32	37,6	71
NMG	13	23	64	18,8	41
JS	8	35	58	58,4	128
CQ	28	42	31	0	-
HN	11	72	17	0	-
SD	22	56	22	0	-
LZ	21	57	23	0	-

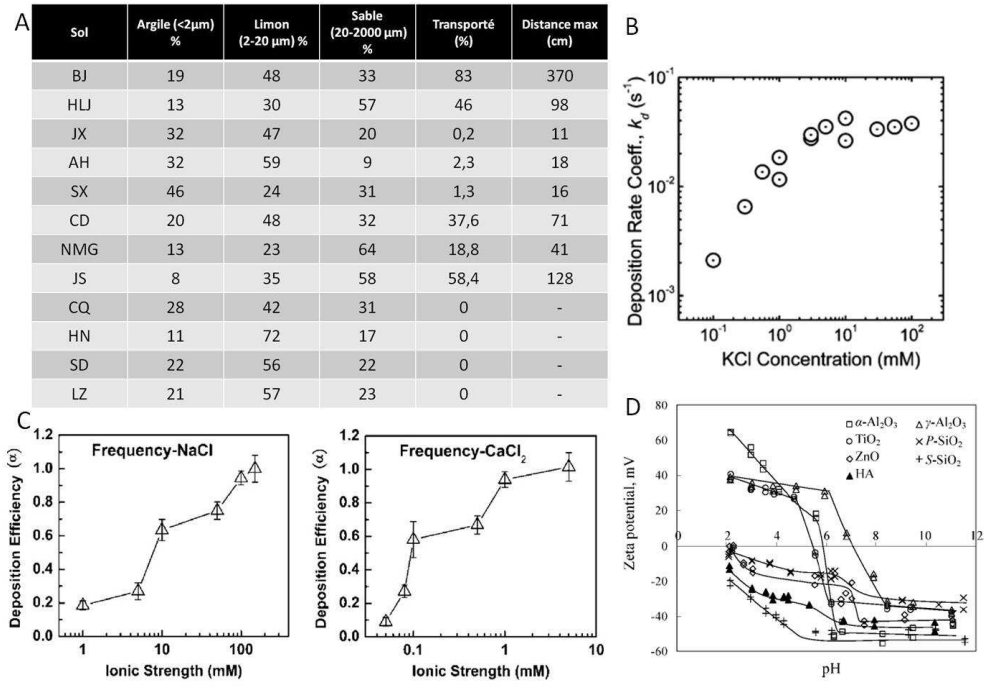


Figure 22 : A. Mobilité des NPs de TiO_2 dans des sols en fonction de leur texture [Fang et al., 2009]. B. Influence de la force ionique (concentration en KCl) sur la rétention des NTC [Jaisi and Elimelech, 2009]. C. Influence des cations mono- ou divalents sur la rétention des NPs de ZnO [Jiang et al., 2010]. D. Influence du pH sur le potentiel zeta de différentes NPs et donc sur leurs chances d'interactions entre elles et avec la matrice [Yang et al., 2009]

Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte est le nanomatériau lui-même et ses **caractéristiques physico-chimiques** telles que le diamètre nominal, le diamètre des agglomérats, la charge de surface ou encore la fonctionnalisation (Darlington *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2011). En effet, plus les NPs, ou leurs agglomérats, ont un diamètre important moins elles sont mobiles.

2.3.2. Impact des nanomatériaux sur les bactéries du sol

Plusieurs études montrent que les nanomatériaux induisent une augmentation de la mortalité des bactéries du sol (Chen *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011; Dimkpa *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2010; Simon-Deckers *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011) qui dépend parfois de la concentration en nanomatériaux (Adams *et al.*, 2006; Baek and An, 2011; Simon-Deckers *et al.*, 2009). Certaines études ont aussi mis en avant la nécessité d'un **contact physique** entre les nanomatériaux et la surface des bactéries pour entrainer leur mort (Dimkpa *et al.*, 2011; Simon-Deckers *et al.*, 2009). Ainsi, lorsque le milieu d'exposition contient des acides humiques, ces derniers ont tendance à faire précipiter les nanomatériaux ou bien à modifier le potentiel de surface des nanomatériaux de telle sorte que les contacts entre bactéries et nanomatériaux sont diminués. Les auteurs constatent en parallèle une diminution de la mortalité (Figure 23A) (Fabrega *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). De même, les bactéries sécrétant des substances extracellulaires polymériques diminueraient les contacts avec les nanomatériaux et donc leur sensibilité. L'**internalisation** de nanomatériaux a été constatée, notamment dans le cas de *Cupriavidus metallidurans* et *Escherichia coli* lors de leur exposition à des NPs de TiO_2 (Simon-Deckers *et al.*, 2009). Les NPs se localisent dans le périplasme sans atteindre le cytoplasme (Figure 23B). L'implication des **ROS** a été évoquée à plusieurs reprises pour expliquer les effets toxiques observés (Figure 23C) (Adams *et al.*, 2006; Dimkpa *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Simon-Deckers *et al.*, 2009).

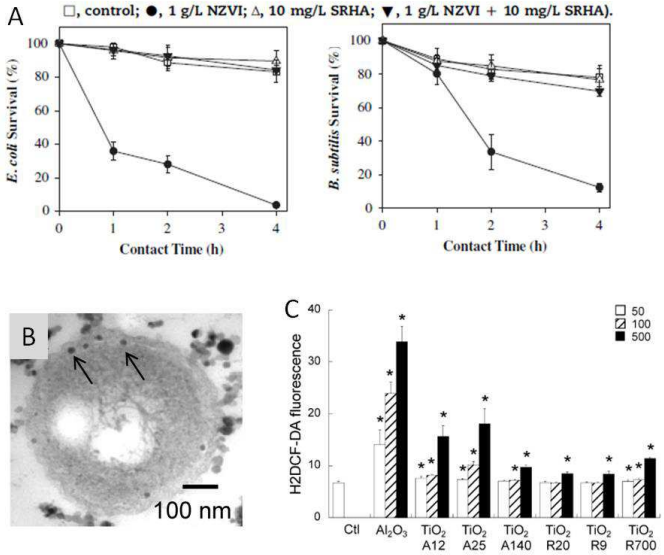


Figure 23 : A. Impact des NPs de fer zéro valent (ZVI) sur deux bactéries *E. coli* et *B. subtilis* et influence de la présence d'acide humique (SRHA) dans le milieu [Chen et al., 2011]. B. Contact et accumulation de NPs de TiO_2 dans la bactérie *C. metallidurans* [Simon-Deckers et al., 2009]. C. Augmentation du stress oxydant chez *C. metallidurans* suite à l'exposition à divers nanomatériaux (concentrations : 50, 100 et 500 mg/L) [Simon-Deckers et al., 2009].

2.3.3. Impact des nanomatériaux sur les nématodes

L'évaluation de la mortalité, de la croissance et de la reproduction des nématodes exposés aux nanomatériaux met en évidence leur toxicité envers ces organismes (Figure 24A) (Wang *et al.*, 2009; Coleman *et al.*, 2010; Heckmann *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Lapied *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; Roh *et al.*, 2010; Unrine *et al.*, 2010; van der Ploeg *et al.*, 2011). Les effets toxiques sont visibles même pour de très faibles concentrations en nanomatériaux. Ainsi, la durée de vie de *Caenorhabditis elegans* exposé à 1 nM de NPs de CeO_2 est diminuée de 12% (Zhang *et al.*, 2011a). De plus, pour la plupart de ces expériences, l'effet de la **dissolution** des nanomatériaux a été étudié sans que la toxicité des nanomatériaux puisse être en totalité imputée à ce phénomène.
Les nématodes se sont révélés capables de prélever les nanomatériaux du milieu d'exposition (Figure 24B) (Coleman *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Unrine *et al.*, 2010). Ainsi, une section au niveau de l'abdomen d'*Eisenia fetida* exposé dans un sol contaminé aux NPs d'Au (20 nm) montre une répartition homogène de l'or sur toute la section (Figure 24C) (Unrine *et al.*, 2010).
Les nanomatériaux peuvent également induire des changements de comportement des nématodes. Ainsi, des tests d'évitement sur sol ont montré que les vers de terre évitent les sols contaminés aux nanomatériaux ou aux formes micrométriques correspondantes au profit de sols non contaminés (Figure 24D) (Coleman *et al.*, 2010; Shoults-Wilson *et al.*, 2011). La toxicité des nanomatériaux a été associée à plusieurs reprises à la production de **ROS** (Hu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011a). Néanmoins, ce mécanisme ne serait pas le seul responsable de la toxicité des nanomatériaux (Ma *et al.*, 2011).

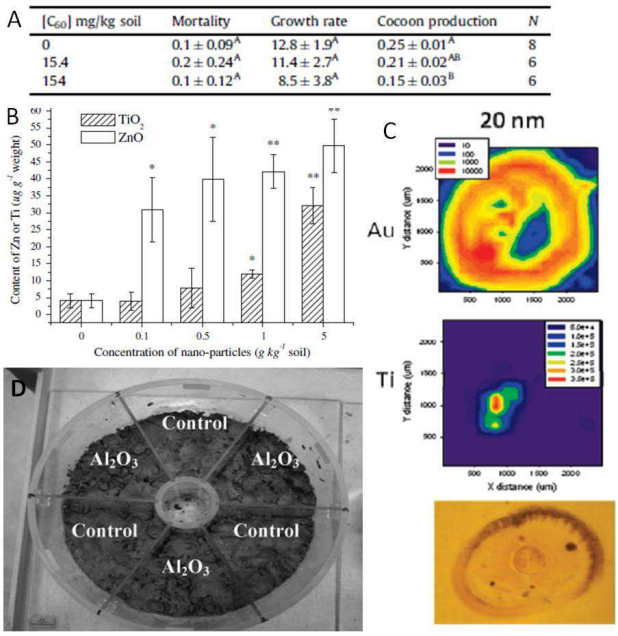


Figure 24 : A. Impact de NPs de C_{60} sur la mortalité, la croissance et la reproduction de *Lumbricus rubellus* [Van der Ploeg et al., 2011]. B. Accumulation de titane et de zinc chez *Eisenia fetida* après exposition à des NPs de TiO_2 ou de ZnO [Hu et al., 2010]. C. Répartition de l'or dans une section d'*Eisenia fetida* après exposition à des NPs d'or. La répartition du titane montre l'accumulation de sol dans l'intestin [Unrine et al., 2010]. D. Dispositif du test d'évitement pour *Eisenia fetida* exposé à Al_2O_3 sous forme nanométrique ou micrométrique [Coleman et al., 2010]

Enfin, les nanomatériaux sont à l'origine d'**effets génotoxiques**. Une étude a montré que certains gènes impliqués dans la régulation des stress étaient surexprimés en présence de nanomatériaux (Roh *et al.*, 2010). En parallèle, certains auteurs ont montré que la présence de 1 g/kg de sol de NPs de TiO_2 entrainait des dommages à l'ADN (Hu *et al.*, 2010).

2.3.4. Impact des nanomatériaux sur une chaine trophique terrestre simplifiée

Comme dans l'écosystème eau, les études concernant l'écosystème sol vont vers plus de complexité, notamment la reconstitution d'une chaine trophique simplifiée. Par exemple, une étude a été menée sur le transfert de NPs d'Au du milieu d'exposition à la plantule de tabac et à la chenille de sphinx du tabac, consommateur final de cette chaine simplifiée. Il s'est avéré que les NPs d'Au remontent les chaines trophiques puisque dans ce cas, elles passent du milieu d'exposition à la plante et à la chenille avec un phénomène de **bioamplification** (Figure 25A). Dans la chenille, l'or se distribue dans tout l'organisme et ne reste pas localisé dans l'intestin (Figure 25B) (Judy *et al.*, 2011).

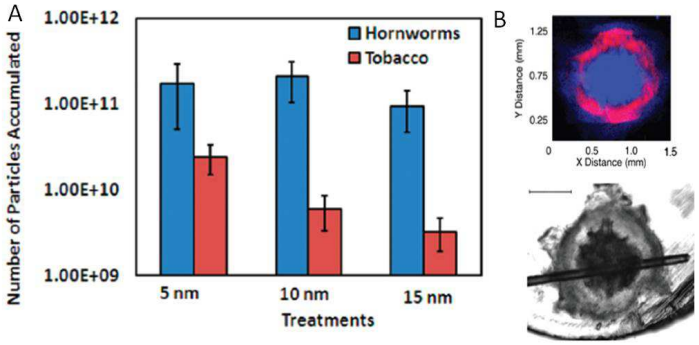


Figure 25 : A. Bioamplification des NPs d'Au dans le tabac et dans la chenille de sphynx selon la taille des NPs [Judy et al., 2011]. B. Localisation de l'or (en rose) dans une section transversale de chenille ayant consommé du tabac contaminé aux NPs d'Au [Judy et al., 2011]

2.4. Devenir des nanomatériaux dans l'écosystème air

L'étude du devenir dans l'air des NPs produites intentionnellement bénéficie des connaissances acquises depuis plusieurs décennies sur le comportement des poussières atmosphériques. Elles revêtent alors le nom de PM 0,1 pour « particule matter » de moins de 0,1 µm. Le milieu atmosphérique est un milieu privilégié de dispersion des particules ultrafines dans l'environnement. En effet, l'étude des poussières atmosphériques montre que c'est par un mouvement de convection que les particules quittent les basses couches de l'atmosphère pour monter jusqu'à 2 à 4 km d'altitude. Elles sont transportées sur de longues distances dans la troposphère. La distance parcourue est inversement proportionnelle à la taille des particules. Les grosses particules (supérieures à 5 µm) ne se déplacent généralement pas au-delà de 500 km. A l'inverse, les particules ultrafines (environ 100 nm) peuvent se déplacer sur de beaucoup plus longues distances (Hett, 2004). Les particules finissent par se déposer soit par dépôt sec continu, soit lors d'épisodes pluvieux ou neigeux. Le temps de résidence atmosphérique d'une poussière varie beaucoup selon sa taille et sa composition (Hett, 2004). Ainsi, les particules atmosphériques les plus grosses restent dans les

basses couches de la troposphère, en dessous de 3000 mètres et retombent en quelques jours dans les environs de leur source d'émission, tandis que les particules ultrafines ont un temps de séjour moyen de 2 ans à 18 km d'altitude. La distance parcourue par une NP dans le milieu atmosphérique dépendra de ses propriétés physico-chimiques et de sa réactivité chimique. En effet, si cette dernière est élevée, elle aura tendance à fixer d'autres polluants présents dans l'air et donc à se déposer plus rapidement sur le sol par sédimentation, la vitesse de sédimentation augmentant avec le diamètre des particules (Hett, 2004).

Une étude a prouvé que 14% des produits contenant des NPs d'Ag libèrent ces NPs dans l'atmosphère lors de leur usage (Quadros and Marr, 2010).

Compte tenu de leur taille, les NPs pourraient donc être facilement dispersées par voie atmosphérique, être transportées sur de très longues distances puis redéposées sur les sols ou les milieux aquatiques très loin de leur lieu d'émission.

Peu d'études ont été réalisées sur des organismes aériens. Néanmoins, l'étude de l'impact de NPs d'argent et d'or sur la drosophile a mis en évidence de nombreuses perturbations comme du stress oxydant, de l'apoptose, des dommages à l'ADN, des problèmes de reproduction et de la surexpression de protéines impliquées dans la régulation de stress (Figure 26A) (Ahamed *et al.*, 2010; Panacek *et al.*, 2011; Pompa *et al.*, 2011). Des changements de phénotypes sont également apparus sur des drosophiles exposées aux NPs d'Ag (Figure 26B). Pour la première fois, une équipe de chercheurs constate une **adaptation** des organismes à la présence de nanomatériaux. En effet, les larves de drosophile dont la nourriture a été contaminée avec 50 ou 100 µg NPs/mL subissent une diminution de leur fertilité pendant les trois premières générations puis cette fertilité réaugmente pour atteindre son niveau initial après 8 générations (Figure 26C). En parallèle, le poids de chaque individu diminue à chaque génération (Figure 26D). Enfin, une autre étude a traité de la toxicité de NPs de SiO_2 envers le charançon montrant 90% de mortalité après exposition (Debnath *et al.*, 2011).

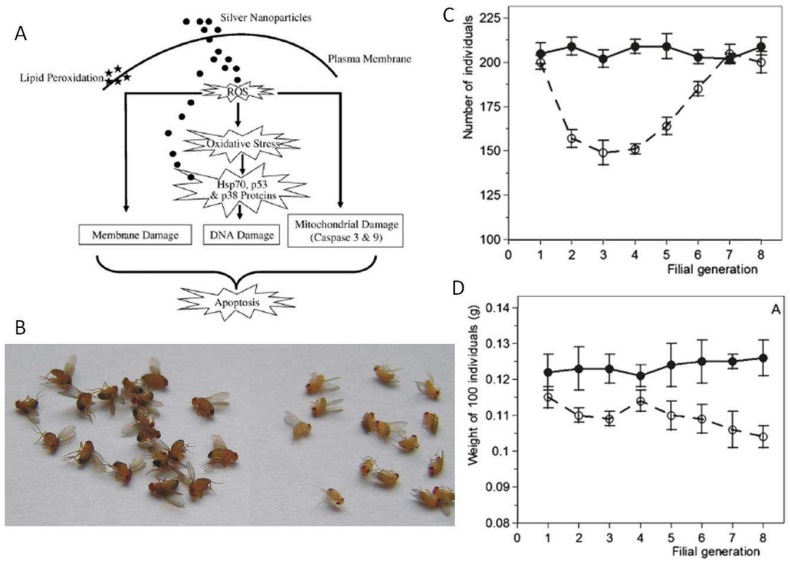


Figure 26 : A. Schéma d'action de NPs d'argent envers *Drosophila melanogaster* [Ahamed et al., 2010]. B. Modification du phénotype de drosophiles exposées à des NPs d'argent (à droite) par rapport aux témoins non exposés à gauche [Panacek et al., 2011]. C. Impact de NPs d'argent sur la reproduction de plusieurs générations de drosophiles [Panacek et al., 2011]. D. Modification du poids des individus selon les générations après exposition aux NPs d'argent [Panacek et al., 2011]

En conclusion, de nombreuses études prouvent que les nanomatériaux ont un effet délétère sur les écosystèmes. Leur biodisponibilité varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu récepteur (eau, sol, air). Le type d'effets toxiques observés varie selon le modèle biologique, le nanomatériau et ses caractéristiques physico-chimiques, le milieu d'exposition ou encore le mode de préparation. Il est ainsi très difficile de comparer les études entre elles pour en tirer des conclusions générales sur le risque associé à la dissémination des nanomatériaux dans l'environnement. De même, il n'est toujours pas possible d'imputer les effets toxiques d'une NP à l'une de ses caractéristiques physico-chimiques (diamètre nominal, diamètre hydrodynamique, phase cristalline, forme,…). Très souvent les études comparent la toxicité des nanomatériaux aux ions qui proviendraient de la dissolution de la particule dans le milieu ainsi qu'à la particule de taille micrométrique correspondante. Différents mécanismes peuvent conduire aux effets toxiques observés, ils varient selon la composition chimique des nanomatériaux. Ainsi, pour des NPs à base de zinc ou d'argent une partie des effets est imputable à la dissolution de la NP alors que ce n'est pas le cas pour des NPs inertes comme le TiO_2. La proportion d'effets toxiques imputables aux ions et aux NPs varie selon le nanomatériau considéré. De plus, il apparait que les NPs sont plus toxiques que les microparticules.

La toxicité peut être « directe » entrainant une augmentation de la mortalité, des dommages à l'ADN, des malformations ou encore des problèmes de reproduction. Dans de nombreux cas, un des mécanismes mis en avant est la génération d'un stress oxydant par les nanomatériaux. La toxicité peut aussi être « indirecte », c'est-à-dire que la présence de nanomatériaux dans le milieu empêche l'accomplissement dans de bonnes conditions de processus biologiques indispensables à la survie de l'organisme (nutrition, photosynthèse). Les nanomatériaux peuvent être internalisés dans les organismes et entrer ainsi dans la chaine alimentaire.

La plupart des auteurs met en évidence une toxicité des nanomatériaux même si les mécanismes restent encore à élucider. Néanmoins, il faut noter que la majorité de ces premières études a été réalisée dans des conditions de laboratoire très éloignées de conditions environnementales. Ainsi, les concentrations testées sont souvent très supérieures à celles attendues dans l'environnement (Gottschalk *et al.*, 2009). Malgré tout, on constate que les études se complexifient et se rapprochent des conditions environnementales (exposition sur des sols naturels ou dans des eaux de mer et diminution des doses testées). L'évolution des études d'écotoxicologie des nanomatériaux a fait l'objet d'une note d'actualité scientifique pour l'ANSES (Annexe 3).

Un type d'organismes vivants n'a pas été passé en revue dans les écosystèmes précédents, ce sont les végétaux. Ils se situent à l'interface entre les trois écosystèmes. En effet, ils sont ancrés dans le sol, se nourrissent à partir d'eau (solution du sol) et effectuent des échanges avec l'air. De plus, les végétaux se situent également à la base des chaines alimentaires qui remontent jusqu'à l'Homme. Ce maillon est donc fondamental à l'étude de l'impact des nanomatériaux sur l'environnement.

3. Impact des nanomatériaux sur les végétaux

L'étude de l'impact des nanomatériaux sur les végétaux a mis en évidence à la fois des effets bénéfiques (stimulation) et des effets négatifs (inhibition). Ces deux aspects seront donc détaillés

séparément. Une autre classification aurait pu être choisie en séparant NPs solubles (Ag, CuO, ZnO) et NPs insolubles. L'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux fera également l'objet d'une partie. Cette accumulation est étudiée soit suite à une exposition racinaire en hydroponie, soit lors d'une exposition racinaire sur sol ou encore après une exposition par voie foliaire. Enfin, l'utilisation de nanomatériaux en biotechnologie sera abordée dans un dernier paragraphe.

L'impact des nanomatériaux sur les végétaux a également fait l'objet d'une note d'actualité scientifique pour l'ANSES (Annexe 4).

3.1. Effets positifs des nanomatériaux sur les végétaux

Les critères les plus facilement mesurables après une exposition concernent le développement du végétal. Ainsi, différentes équipes de chercheurs ont constaté qu'une exposition aux nanomatériaux entrainait une induction de paramètres tels que le taux de germination (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011), l'élongation des différentes parties de la plante (Tripathi *et al.*, 2011; Khodakovskaya *et al.*, 2009), la biomasse (Gao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2005) ou encore le rendement en graines (Sahandi *et al.*, 2011).

Ainsi, une étude a montré que la germination de graines de tomates exposées à des MWCNTs était plus rapide et plus efficace (Figure 27A), que ces graines donnaient des tiges plus longues (Figure 27B) et une biomasse 2,5 fois plus importante (Khodakovskaya *et al.*, 2009) que les graines non exposées. Les auteurs ont conclu que cette induction pouvait être liée à une meilleure imbibition de la graine.

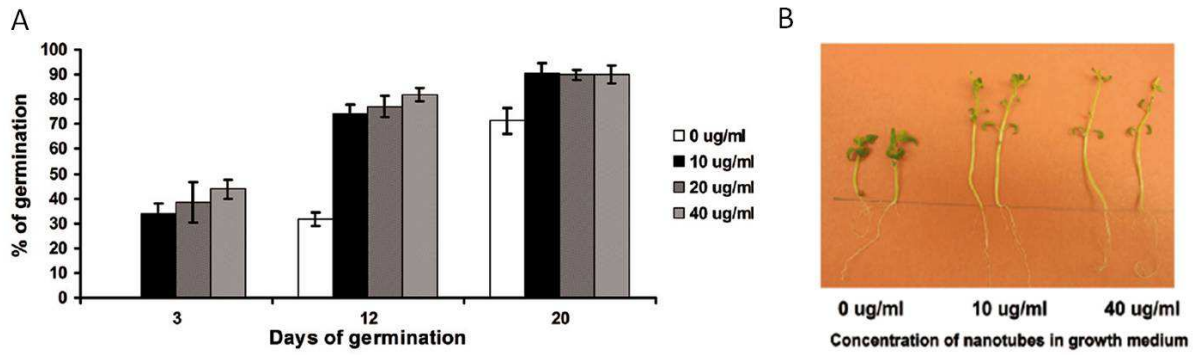


Figure 27 : Effets positifs des MWCNTs sur la germination de la tomate (A) et sur l'élongation de ses tiges (B) [Khodakovskaya et al., 2009]

Le métabolisme de l'épinard a également fait l'objet de nombreuses études de la part d'une équipe de chercheurs mettant ainsi en évidence un meilleur déroulement de la photosynthèse (Hong *et al.*, 2005a; Hong *et al.*, 2005b; Gao *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2007a; Lei *et al.*, 2007b; Gao *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2007a; Su *et al.*, 2007b; Su *et al.*, 2008a; Su *et al.*, 2008b; Su *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2005), une activité accrue de la rubisco (Gao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008a) ainsi qu'un métabolisme azoté plus efficace (Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) après une exposition à des NPs de TiO_2. De plus, ces NPs protégeraient le

végétal lors d'un stress (acide linolénique, radiations UV) en limitant la production de ROS (Hong *et al.*, 2005a; Lei *et al.*, 2008).

3.2. Effets délétères des nanomatériaux sur les végétaux

3.2.1. Effets délétères sur le développement et le métabolisme

Si quelques études montrent un effet positif de nanomatériaux sur des végétaux, le plus grand nombre relate des effets délétères.

Ainsi, les premières études ont été des études de criblage peu approfondi de l'impact de différents nanomatériaux sur différents végétaux (Canas *et al.*, 2008; Yang and Watts, 2005; Lin and Xing, 2007; Lee *et al.*, 2010a; Stampoulis *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2010b; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b). La conclusion découlant de ces études est que les effets constatés dépendent à la fois de l'espèce végétale et du nanomatériau considérés. Cette conclusion est par exemple illustrée dans une étude sur l'impact de MWCNTs, de NPs d'Al, d'Al_2O_3, de Zn et de ZnO sur 6 espèces végétales différentes : radis, colza, ray-grass, laitue, maïs et concombre (Lin and Xing, 2007). Ainsi les NPs d'Al induisent l'élongation racinaire du colza et du radis mais inhibent celle du maïs. Les MWCNTs n'induisent l'élongation racinaire que du ray-grass ou encore les NPs d'Al_2O_3 n'inhibent que l'élongation racinaire du maïs (Figure 28A).

Néanmoins, ces études ont permis de souligner l'importance de prendre en compte les phénomènes de dissolution de certaines NPs (Murashov, 2006; Watts and Yang, 2006). Par la suite, la majorité des études a inclus l'étude de la toxicité des ions dissous provenant des NPs testées. On peut alors distinguer deux cas : les NPs solubles (Zn, Cu, Ag) dont une grande partie des effets peut être attribuée aux ions et les NPs insolubles (CeO_2, TiO_2, NTC,…). Ainsi, des études menées sur le radis, le colza, le ray-grass, la laitue, le maïs, le concombre et la courgette ont montré une diminution de la germination et de l'élongation racinaire pour toutes ces espèces après une exposition à des NPs à base de Zn mais des effets beaucoup moins prononcés lors d'expositions à des NPs à base d'Al ou de MWCNTs (Figure 28A) (Lin and Xing, 2007).

Dans un deuxième temps, les études se sont plus focalisées sur les effets des nanomatériaux sur le métabolisme des végétaux.

Le principal critère étudié a été la photosynthèse (Racuciu and Creanga, 2007c; Racuciu and Creanga, 2007b; Racuciu and Creanga, 2009; Racuciu *et al.*, 2009; Cotae and Creanga, 2005; Lin *et al.*, 2009a). Par exemple, des études menées sur divers végétaux (maïs, pavot, chélidoine, courgette) ont montré une diminution de la teneur en chlorophylle A et B après une exposition à des NPs de fer (Fe_2O_3, Fe_3O_4) (Racuciu and Creanga, 2007c; Racuciu and Creanga, 2007b; Racuciu and Creanga, 2009; Racuciu *et al.*, 2009; Cotae and Creanga, 2005).

D'autres études ont mis en évidence une perturbation du réseau de microtubules chez *Arabidopsis thaliana* après exposition à des NPs de TiO_2 (Wang *et al.*, 2011b) ou à des fullerènes (Liu *et al.*, 2010). Ou encore une étude a montré que les grains de pollen exposés à des NPs de Pd perdaient leur viabilité (Speranza *et al.*, 2010).

Parmi les mécanismes à l'origine de la phytotoxicité des nanomatériaux, le **stress oxydant** est souvent mentionné (Panda *et al.*, 2011; Yang and Watts, 2005; Wang *et al.*, 2011a; Yuan *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009a; Tan *et al.*, 2009). Le stress oxydant est évalué à travers l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase ou catalase par exemple) ou encore par l'augmentation de la peroxydation lipidique (Wang *et al.*, 2011a; Ghosh *et al.*, 2010). Une équipe de chercheurs a mis en évidence l'augmentation de la mort cellulaire et des dommages à l'ADN ainsi qu'une accumulation accrue de ROS (Figure 28B, C) suite à une exposition à des NPs d'Ag. Lorsque les auteurs ajoutent dans le milieu des espèces neutralisant O_2°- et H_2O_2, les effets toxiques tels que la mort cellulaire et les dommages à l'ADN disparaissaient, prouvant que la toxicité était liée à ces ROS (Panda *et al.*, 2011).

Enfin, des études de l'impact des nanomatériaux ont été réalisées sur des plantes exposées sur des sols contaminés. A nouveau, ces études ont donné lieu à des résultats contradictoires. Certains auteurs ne constatent aucun effet lorsque l'exposition est réalisée sur sol (Doshi *et al.*, 2008) alors que d'autres mettent en évidence un effet inhibiteur des nanomatériaux (Shah and Belozerova, 2009; Oleszczuk *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011; Asli and Neumann, 2009; El-Temsah and Joner, 2010). Il semblerait que les effets toxiques des nanomatériaux soient modulés en fonction de la texture du sol. Ainsi, les effets d'inhibition de croissance des parties aériennes de l'orge suite à une exposition à des nZVI apparaissent à une concentration de 800 mg/L dans un sol argileux alors que dans un sol sableux, ils apparaissent dès 400 mg/L (Figure 28D) (El-Temsah and Joner, 2010).

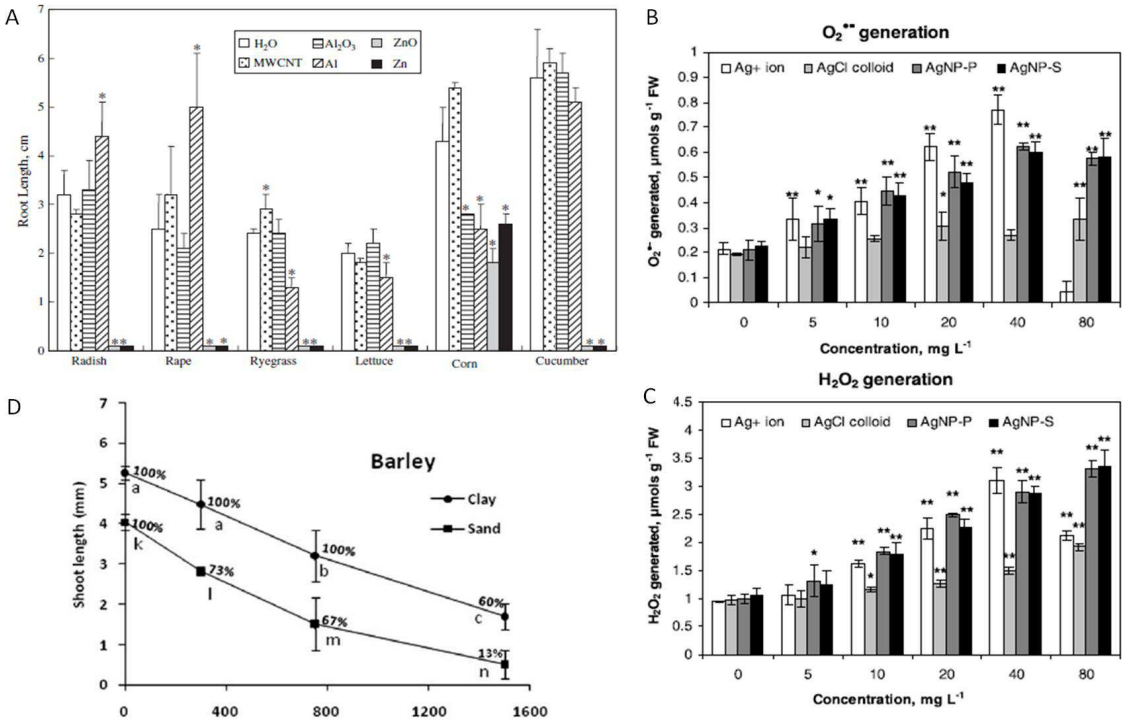


Figure 28 : A. Screening de 5 nanomatériaux sur 6 plantes différentes [Lin and Xing, 2007]. Influence de NPs d'Ag (industrielles P ou biosynthétisées S) sur la génération d'espèces réactives de l'oxygène : O_2°- (B) et H_2O_2 (C) [Panda et al., 2011]. D. Impact de NPs de ZVI (mg/L) sur l'élongation de la tige de l'orge selon le type de sol [El Temsah and Joner, 2010].

3.2.2. Effets génotoxiques

Divers effets génotoxiques ont été constatés après une exposition aux nanomatériaux : diminution de l'indice mitotique (Kumari *et al.*, 2009; Klancnik *et al.*, 2011; Castiglione *et al.*, 2011), augmentation des aberrations chromosomiques (Figure 29A, B, C) (Racuciu and Creanga, 2007a; Kumari *et al.*, 2009; Pavel *et al.*, 1999; Pavel and Creanga, 2005; Racuciu and Creanga, 2009; Racuciu *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2010; Castiglione *et al.*, 2011) et augmentation des dommages à l'ADN (Figure 29D) (Klancnik *et al.*, 2011; Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Ghosh *et al.*, 2010). Ainsi, par exemple, les effets génotoxiques des NPs de TiO_2 sur des cellules d'ail et de tabac ont été mis en évidence à travers le test des comètes, le dénombrement des micronoyaux et la présence d'aberrations chromosomiques (Ghosh *et al.*, 2010; Klancnik *et al.*, 2011). De même, les NPs d'Ag sont à l'origine de cassures de l'ADN comme le suggère le test des comètes (Figure 29E) (Panda *et al.*, 2011).

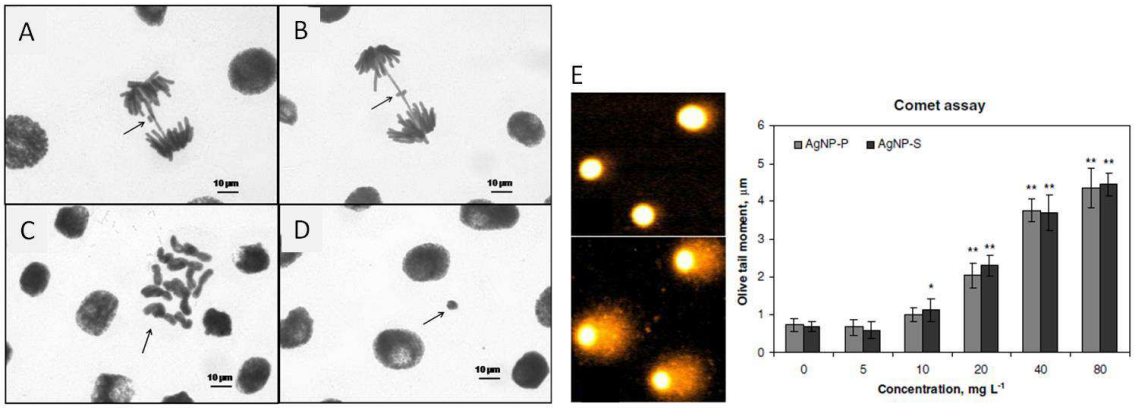


Figure 29 : NPs de TiO_2 induisant des ponts de chromatine (A-B), des mitoses en C (C) et des micronoyaux (D) [Klancnik et al., 2011]. E. NPs d'Ag (industrielles P ou biosynthétisées S) induisant des cassures d'ADN double brins visibles sur le test des comètes (image du haut : témoin, image du bas : NP d'Ag-S) [Panda et al., 2011].

Les effets modulateurs des NPs sur l'expression des gènes commencent également à être étudiés. Des changements dans l'expression des gènes suite à une exposition à des MWCNTs ont été constatés chez la tomate. Les auteurs ont notamment démontré une surexpression des gènes impliqués dans la régulation de stress et dans la régulation du fonctionnement des aquaporines (Khodakovskaya *et al.*, 2011).

3.3. Accumulation des nanomatériaux dans les végétaux

Des études ont également été réalisées pour étudier l'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux. Ici encore, on peut distinguer deux catégories de nanomatériaux : les NPs solubles et les NPs insolubles.

Dans le premier cas, ce sont surtout les ions issus des NPs qui s'accumulent dans les végétaux. C'est par exemple le cas du zinc (Figure 30A) ou de l'argent (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2011; Battke *et al.*, 2008). Dans le second cas, les NPs sont transférées dans le végétal soit sans modification de leur structure comme pour les fullerènes ou les NPs de CeO_2 (Figure 30A, B, C) (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Lin and Xing, 2008; Ghodake *et al.*, 2011;

Lee *et al.*, 2008; Khodakovskaya *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011; Alimohammadi *et al.*, 2011; Kurepa *et al.*, 2010) soit après biotransformation des NPs comme pour les NPs de $Ni(OH)_2$ (Parsons *et al.*, 2010).

Ainsi, des chercheurs ont montré que les MWCNTs pénétraient dans la graine de tomate (Khodakovskaya *et al.*, 2009) et étaient transférés dans les racines des jeunes plantules, dans les feuilles ainsi que dans les fruits (Khodakovskaya *et al.*, 2011).

Une autre étude a également mis en évidence la transmission de NPs de fullerène d'une génération à l'autre chez le riz (Figure 30D) (Lin *et al.*, 2009c).

En revanche, dans certaines études l'accumulation des nanomatériaux étudiés n'a pas pu être mise en évidence. C'est notamment le cas de certains NTC (Wild and Jones, 2009; Canas *et al.*, 2008) ou encore de certaines NPs comme les Fe_2O_3 (Wang *et al.*, 2011a).

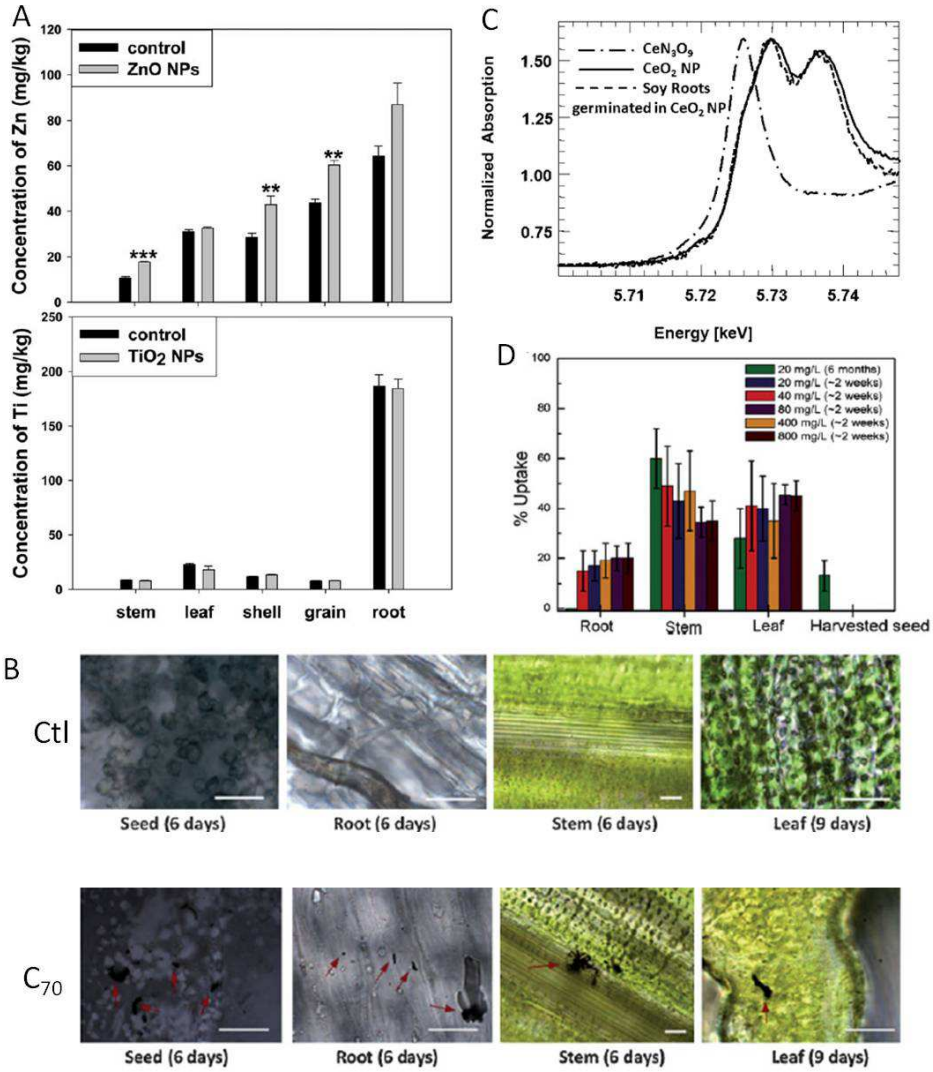


Figure 30 : A. Accumulation de zinc et de titane dans le blé exposé sur sol [Du et al., 2011]. B. Visualisation de fullerènes dans divers organes du riz [Lin et al., 2009]. C. Identification de la forme du cérium dans les racines de soja [Lopez-Moreno et al., 2010b]. D. Internalisation, translocation et transmission à la génération future de fullerènes dans le riz [Lin et al., 2009]

L'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux a également été étudiée lorsque l'exposition avait lieu sur sol. Les auteurs concluent à un transfert limité des NPs du sol aux plantes (Doshi *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2008) voire nul (Doshi *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Birbaum *et al.*, 2010). Lorsque les métaux sont dosés dans les plantes un doute subsiste sur leur forme physico-chimique : ions ou NPs (Doshi *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011). Ainsi par exemple, dans le blé exposé à des NPs de TiO_2 et de ZnO, les NPs de TiO_2 se trouvent adsorbées sur la surface des racines et dans quelques cas elles sont internalisées dans les cellules des racines. A l'inverse, les NPs de ZnO se dissolvent dans le sol et la teneur en zinc dans la plante augmente sans qu'aucune particule ne soit visible dans les tissus végétaux (Figure 30A) (Du *et al.*, 2011).

La confrontation de ces études souligne l'importance de la **texture du sol** dans la biodisponibilité des NPs. De plus, une étude a montré que les NPs de Fe_3O_4 étaient accumulées dans des citrouilles exposées en hydroponie, et dans une moindre mesure lorsque l'exposition se faisait sur sable. Ces NPs étaient indétectables dans les tissus végétaux lorsque les plantules étaient exposées sur un sol naturel (Zhu *et al.*, 2008).

Enfin, une dernière voie de contamination a été testée : la voie foliaire (Figure 31A) (Eichert *et al.*, 2008; Birbaum *et al.*, 2010). Dans un cas, les NPs de CeO_2 (37 nm) ne s'accumulent pas dans les feuilles de maïs (Birbaum *et al.*, 2010). Dans le second cas, les auteurs notent l'accumulation de NPs de polystyrène (43 nm) dans les feuilles de fève. Ces NPs pénètrent dans la feuille en passant par les stomates (Figure 31B) (Eichert *et al.*, 2008).

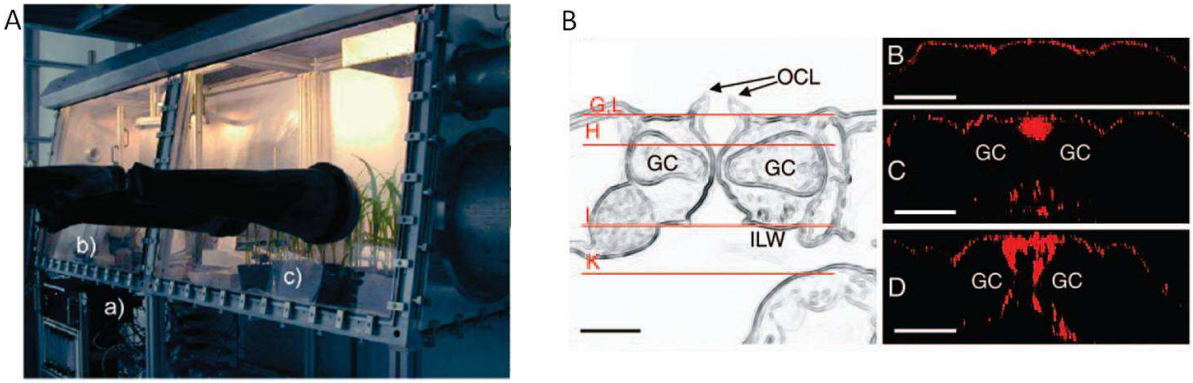


Figure 31 : A. Exemple de dispositifs d'exposition foliaire : a) unité de production des NPs, b) système de ventilateur pour générer l'aérosol, c) culture du maïs dans une boîte à gants [Birbaum et al., 2010]. B. Pénétration de NPs de polystyrène fluorescentes par les stomates lors d'une exposition par voie foliaire (*OCL : outer cuticular ledges, GC : guard cell, ILW : inner lateral guard cell wall, barre d'échelle 10 µm*) [Eichert et al., 2008]

Ces deux derniers types d'exposition (sur sol et par voie foliaire) n'ont que très peu été étudiés pour le moment et nécessitent donc de plus amples investigations.

3.4. Utilisation des nanomatériaux en biotechnologie

Les NPs du fait de leur possibilité d'accumulation dans les végétaux sont étudiées pour être éventuellement utilisées comme outils biotechnologiques. Elles pourraient alors jouer le rôle de vecteur de matière active en permettant, en plus, de cibler certains organes (Corredor *et al.*, 2009;

Galbraith, 2007; Gonzalez-Melendi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Moeller and Wang, 2008; Torney *et al.*, 2007; Eggenberger *et al.*, 2010).

Ainsi, une étude a été menée sur la citrouille, dans laquelle des NPs de fer enrobées de carbone étaient injectées au niveau d'un pétiole. Deux aimants ont été placés sur la plante, un au niveau des feuilles et l'autre au niveau des racines (Figure 32A). Les chercheurs ont ensuite fait des coupes avant, après et au niveau des aimants. Leur conclusion est que des NPs de 50 nm peuvent être guidées grâce à un aimant vers un point précis du végétal (Figure 32B-G). Les organes situés après les aimants ou bien sur des sections sans aimants sont dépourvus de NPs (Gonzalez-Melendi *et al.*, 2008).

L'idée d'utiliser des NPs en biotechnologie végétale n'en est qu'à ses balbutiements. Il reste encore à démontrer le bénéfice d'utiliser des NPs à de telles fins, et le fait que cela soit sans risque pour l'environnement et l'homme. La rentabilité de tels outils sera très certainement aussi un frein à leur développement.

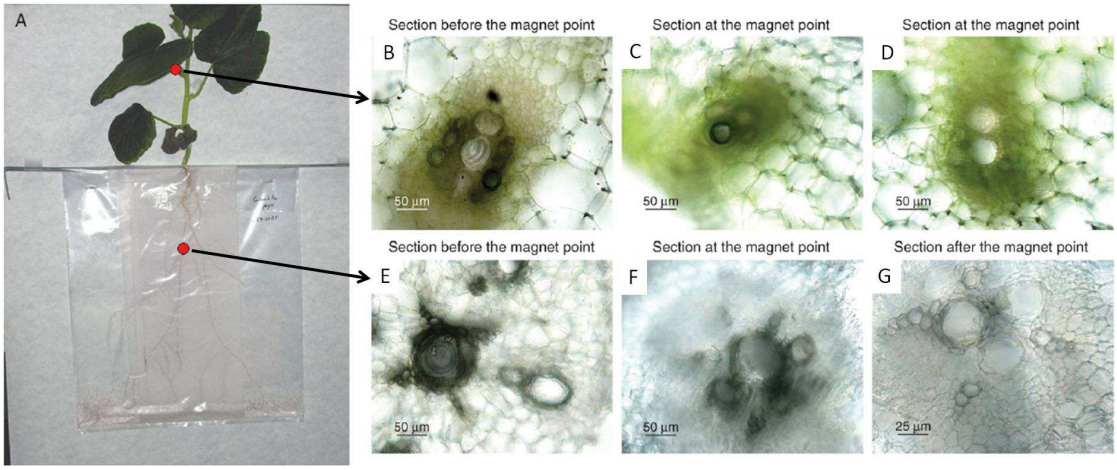


Figure 32 : A. Plant de citrouille cultivé en hydroponie dans lequel on injecte des NPs de fer par un pétiole, les deux points rouges représentent la localisation des aimants. Coupes de pétiole avant l'aimant (B), au niveau de l'aimant (C) et après l'aimant (D). Coupes de racine avant l'aimant (E), au niveau de l'aimant (F) et après l'aimant (G). [Gonzalez-Melendi et al., 2008]

De plus, certains végétaux sont capables de produire des NPs à partir d'ions dans leur milieu nutritif (Nabikhan *et al.*, 2010; Krishnaraj *et al.*, 2010; Bali and Harris, 2010; Dubey *et al.*, 2010; Gade *et al.*, 2010; Bali *et al.*, 2010a; Haverkamp and Marshall, 2009; Haverkamp *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2007). Ils permettraient alors la biosynthèse de NPs tout en limitant les risques lors de la production.

4. Synthèse du chapitre

SYNTHESE DU CHAPITRE

➢ **Nanomatériaux** : matériaux présentant une, deux ou trois dimensions externes dans le domaine nanométrique. Les NPs du fait de leur petite taille acquièrent de nouvelles propriétés.

➢ Nanotechnologies en fort développement ces 10 dernières années. NPs présentes dans de très nombreux et divers domaines et dans des produits de consommation courante.

➢ Choix des NPs étudiées : produites en grande quantité et insolubles : **TiO_2** et **NTC**.

➢ En parallèle, augmentation de la dissémination des NPs dans l'environnement. Teneur dans l'environnement en NPs manufacturées d'une dizaine à quelques centaines de µg par litre ou par kg.

➢ Devenir des NPs dans l'environnement selon les propriétés du milieu récepteur : eau ou sol (agglomération, biodisponibilité, sédimentation, …).

➢ Impact des NPs sur les écosystèmes : effets délétères divers soit liés aux effets toxiques des NPs soit car ces dernières empêchent le bon déroulement de fonctions élémentaires telles que la nutrition ou la photosynthèse.

➢ Végétal : le seul organisme sur lequel les NPs exercent à la fois des effets inducteurs et inhibiteurs selon l'espèce végétale et la NP considérées. Accumulation de nanomatériaux.

➢ Le Tableau 3 récapitule les connaissances concernant l'impact des NTC et des NPs de TiO_2 sur les plantes. La majorité des articles a été publié au cours de cette thèse.

Tableau 3 : Résumé des résultats sur l'impact des NPs de TiO_2 et des NTC sur les végétaux

	NPs de TiO_2	NTC
Développe-ment	**Germination** : diminution (Castiglione *et al.*, 2011), peu d'effet (Garcia *et al.*, 2011) ou induction (Zheng *et al.*, 2005) **Elongation racinaire** : diminution (Castiglione *et al.*, 2011) **Biomasse** : diminution (Du *et al.*, 2011; Asli and Neumann, 2009), pas d'effet (Seeger *et al.*, 2009) ou induction (Zheng *et al.*, 2005) **ETP** : diminution (Asli and Neumann, 2009) ou pas d'effet (Seeger *et al.*, 2009)	**Germination** : diminution (Canas *et al.*, 2008; Oleszczuk *et al.*, 2011), pas d'effet (Lin and Xing, 2007; Stampoulis *et al.*, 2009) ou induction (Khodakovskaya *et al.*, 2009) **Elongation racinaire** : diminution (Canas *et al.*, 2008; Oleszczuk *et al.*, 2011) ou peu d'effets (Lin and Xing, 2007) **Biomasse** : diminution (Stampoulis *et al.*, 2009) ou induction (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2011) **ETP** : induction (Tripathi *et al.*, 2011)
Métabolisme	Induction **photosynthèse** (Su *et al.*, 2009), **métabolisme azoté** (Yang *et al.*, 2007), **activité de la rubisco** (Ma *et al.*, 2008) **Stress oxydant** : diminution (Lei *et al.*, 2008) Perturbation du réseau de **microtubules** (Wang *et al.*, 2011b)	
Génotoxicité	Induction effets génotoxiques (Ghosh *et al.*, 2010; Klancnik *et al.*, 2011; Castiglione *et al.*, 2011)	Modification de l'expression de certains gènes (Khodakovskaya *et al.*, 2011)
Accumulation	Hydroponie : Accumulation (3 nm) (Kurepa *et al.*, 2010). Sol : pas d'accumulation (20 nm) (Du *et al.*, 2011)	Accumulation (Wild and Jones, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011) Pas d'accumulation (Lin *et al.*, 2009c)

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 53

1. Nanomatériaux employés ; caractérisation physico-chimique 55
   1.1. Synthèse des nanopoudres 55
   1.2. Analyse des nanopoudres 57
   1.3. Mise en suspension des nanopoudres 61
   1.4. Analyse des suspensions de nanomatériaux 62
2. Modèles biologiques, conditions de culture et d'exposition 64
   2.1. Espèces végétales 64
   2.2. Conditions de culture 69
   2.3. Conditions d'exposition 69
3. Analyse de la répartition et de l'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux 71
   3.1. Techniques basées sur les interactions rayonnement-matière 71
   3.2. Autoradiographie 88
   3.3. Quantification par spectroscopie de masse couplée à un plasma inductif 89
4. Impact des nanomatériaux sur le développement et la physiologie des végétaux 91
   4.1. Impact sur le développement 91
   4.2. Impact sur la photosynthèse: teneur en pigments chlorophylliens 92
   4.3. Evaluation du stress oxydant : dosage du peroxyde de dihydrogène et de la peroxydation lipidique 93
   4.4. Impact sur la nutrition hydrominérale : dosage par chromatographie ionique 94
5. Statistiques 95
6. Synthèse du chapitre 95

Ce chapitre a pour but de présenter, dans un premier temps, les différents nanomatériaux et végétaux qui ont fait l'objet de cette étude. Dans un deuxième temps, les différentes techniques employées pour répondre à notre problématique seront détaillées. Ainsi, les techniques utilisées pour caractériser les nanomatériaux seront développées, suivies des techniques d'imagerie et de quantification, pour finir sur la description des méthodes appliquées pour évaluer la phytotoxicité des nanomatériaux.

1. Nanomatériaux employés ; caractérisation physico-chimique

Les nanomatériaux employés dans cette étude sont de deux types : les NPs de TiO_2 et les NTC.
Pour les NPs de TiO_2, un panel de particules a été choisi, leur diamètre nominal varie de 12 à 700 nm et la phase cristalline peut être anatase (A) ou rutile (R) ou un mélange des deux. Dans le manuscrit, les TiO_2 seront dénommées d'une lettre A ou R représentant leur phase cristalline majoritaire, suivie d'un chiffre indiquant leur diamètre nominal.
Les NTC peuvent être de type double-parois (DWCNT) ou multi-parois (MWCNT) et ont différentes caractéristiques de surface suivant qu'ils sont bruts de synthèse ou oxydés.
Ces nanomatériaux proviennent soit de laboratoires avec lesquels nous collaborons soit de sources commerciales.

1.1. Synthèse des nanopoudres

1.1.1. Nanoparticules de dioxyde de titane

Trois NPs de TiO_2 (A12, R20, R35) ont été synthétisées par pyrolyse laser au laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay (Pignon *et al.*, 2008). Les autres proviennent de sources commerciales.

La pyrolyse laser, représentée en Figure 33A, repose sur l'interaction entre un faisceau laser infrarouge CO_2 et un flux de réactifs gazeux ou liquides dans un réacteur sous atmosphère contrôlée. Le transfert d'énergie vers les réactifs provoque une élévation de température dans la zone de réaction. Les précurseurs sont dissociés et une flamme apparaît dans laquelle des NPs sont formées (Figure 33B). Une caractéristique du procédé est de produire des NPs sans interaction avec les parois du réacteur conduisant à l'obtention de produits « propres ». Parmi les différentes méthodes de synthèse de nanomatériaux, la pyrolyse laser se distingue par sa souplesse et la variété des composés qu'elle peut produire tant en termes de composition chimique que de morphologie et de cristallinité (Herlin-Boime *et al.*, 2008). Les principaux paramètres ajustables sont la nature des précurseurs (contrôle de la nature chimique des NPs), la puissance laser (contrôle de la phase cristalline) et le débit des réactifs (contrôle de la taille). Cette technique permet de synthétiser des NPs de petite taille (couramment de 15 à 50 nm) avec une répartition de taille étroite et une grande pureté chimique. Elle autorise également de bons rendements de production, de l'ordre de 100 g/h pour les NPs de carbure de silicium à l'échelle du laboratoire.

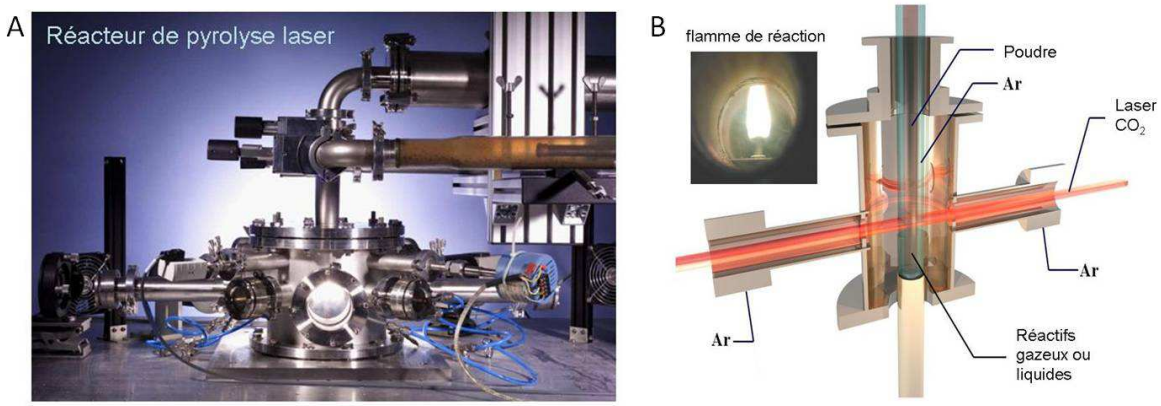


Figure 33 : A. Installation de pyrolyse laser du CEA de Saclay, B. Principe du fonctionnement de la pyrolyse laser

1.1.2. Nanotubes de carbone

Les différents lots de NTC utilisés dans cette étude ont été synthétisés par dépôt chimique en phase vapeur (CCVD). La CCVD est une méthode de production chimique permettant d'obtenir des nanotubes extrêmement purs et parfaitement alignés. Elle est très répandue dans l'industrie des semi-conducteurs pour produire des couches minces. Le procédé de dépôt chimique en phase vapeur consiste à mettre un composé volatil du matériau à déposer (exemple : toluène, benzène) en contact soit avec un autre gaz (argon) au voisinage de la surface à recouvrir, soit avec la surface elle-même. On provoque alors une ou plusieurs réactions chimiques, donnant au moins un produit solide. Ce produit solide croît jusqu'à l'épaisseur désiré de matériaux. Le résultat est donc une couche mince de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. Les dépôts se font à pression variable, mais il faut systématiquement un apport énergétique pour favoriser ces réactions. Ainsi, les réactions ont lieu dans un four dont la température peut atteindre 900°C (Belmonte, 2010).

Les nanotubes de carbone double-parois (DWCNT) sont synthétisés au CIRIMAT à Toulouse, par CCVD, en utilisant comme catalyseur un mélange à base de $Mg_{0,99}Co_{0,075}Mo_{0,025}O$ qui permet d'orienter la synthèse vers les DWCNTs plutôt que vers les MWCNTs. En fin de synthèse, les nanotubes subissent un traitement acide (HCl) qui détruit le Mg. On obtient alors les DWCNTs bruts. Ils peuvent subir, en plus, un traitement à l'acide nitrique qui a pour conséquence de greffer des fonctions oxygénées à la surface des tubes, ce sont les DWCNTs oxydés. Les précurseurs résiduels (Co, Mo) sont encapsulés à l'intérieur des tubes et donc non biodisponibles (Flahaut *et al.*, 2003).

Les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) sont synthétisés par le laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay par CCVD, assisté par aérosol (AA-CCVD pour Aerosol Assisted Catalyst Chemical Vapor Deposition), dans laquelle le précurseur est transporté jusqu'au substrat au moyen d'un aérosol liquide:gaz qui peut être généré par ultrasons. Cette technique est particulièrement adaptée dans le cas de précurseurs non volatiles. Dans ce cas, le précurseur est un mélange toluène-ferrocène et le catalyseur un mélange Fe_2O_3/Fe_3O_4. En fin de synthèse, le catalyseur se trouve à la base des tubes. Les nanotubes sont donc recuits pour éliminer le fer restant (Pinault *et al.*, 2005; Glory *et al.*, 2007). Lors des synthèses de MWCNTs, deux types de précurseurs ont été utilisés : des précurseurs à base de ^{12}C ou des précurseurs à base de ^{14}C (500 mCi). Ce deuxième lot est à

l'origine de MWCNTs radiomarqués ($MW^{14}CNT$), synthétisés en vue de leur observation et quantification par autoradiographie dans les tissus végétaux. Ce procédé de fabrication a été mis au point par l'équipe édifices nanométriques du Service des Photons Atomes et Molécules et par le service de chimie des molécules marquées pour le marquage par carbone 14, tous deux au CEA de Saclay.

1.2. Analyse des nanopoudres

Ces nanomatériaux parviennent au laboratoire sous forme de poudres blanchâtres (TiO_2) ou noires (NTC). Dans un premier temps, les poudres sont analysées pour étudier les caractéristiques physico-chimiques des NPs individuelles.

1.2.1. Surface spécifique, méthode BET

La surface spécifique d'une particule représente une surface par unité de masse, généralement exprimée en $m^2.g^{-1}$. Elle désigne la surface totale d'un objet et englobe ainsi, en particulier, la surface des aspérités de la particule comme les pores.

La méthode BET tient son nom des trois chercheurs qui l'ont découverte : Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett et Edward Teller. Elle est basée sur la théorie de Langmuir concernant l'adsorption physique d'une couche monomoléculaire de gaz à la surface d'un solide. Ils ont étendu cette théorie à des couches multiples (Brunauer *et al.*, 1938). En pratique, après une étape de dégazage sous vide et à chaud qui permet de nettoyer la surface de toutes les impuretés adsorbées, les nanopoudres sont brutalement descendues à basse température avec de l'azote liquide et mises en contact avec un gaz N_2/He. Les atomes d'azote vont s'adsorber à la surface des particules. Vient ensuite une phase de désorption à température ambiante pendant laquelle le nombre de molécules d'azote désorbées est mesuré. Connaissant la masse de nanopoudre, il est alors possible de remonter à la surface spécifique des nanomatériaux.

Les mesures sont faites au Laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay sur un Micromeritics Flowsorb 2300 (Norcross, USA) sur environ 100 mg de poudre de NPs (Figure 34).



Figure 34 : Photo du dispositif BET du Laboratoire Francis Perrin

1.2.2. Phase cristalline, diffraction des rayons X

La structure cristalline est déterminée par la méthode de diffraction des rayons X. La diffraction des rayons X (DRX ou en anglais XRD pour X Ray Diffraction) est une technique physico-chimique reposant sur l'interaction rayonnement-matière pour déterminer l'organisation de la matière. Cette technique s'applique uniquement aux composés cristallisés. Elle permet notamment de distinguer des composés possédant la même composition chimique brute mais une forme cristalline différente. Le phénomène de diffraction a été largement étudié par la famille Bragg, ce qui leur valu le prix Nobel de physique en 1915. L'application de la diffraction à l'identification des phases cristallines a été découverte en 1919 par Peter Debye et Paul Scherrer. La méthode générale consiste à bombarder un échantillon de rayons X puis d'étudier l'intensité des rayons X qui sont diffusés selon l'orientation dans l'espace.

La mesure s'effectue dans un montage nommé chambre de Debye-Scherrer (Figure 35A) sur un échantillon sous forme de poudre introduit dans un capillaire. Ce capillaire tourne sur lui-même pendant toute la durée de la mesure grâce à un moteur. L'échantillon est bombardé par un faisceau monochromatique de rayons X incidents. Ces rayons entrent en interaction avec le cortège électronique des atomes constituant l'échantillon. Les rayons subissent alors une diffusion élastique (conservation de l'énergie et de la longueur d'onde) aussi appelé diffusion de Rayleigh. Ces rayons diffusés interférent entre eux, soit de façon destructive : les ondes s'annulent, soit de façon conservative : les ondes s'additionnent. On parle alors de diffraction. Les rayons sont diffractés sous forme de cônes. Derrière l'échantillon se situe une plaque photographique sensible aux rayons X. On enregistre sur cette plaque l'intensité détectée en fonction de l'angle 2θ du faisceau sous forme de cercles concentriques plus ou moins lumineux. Ce sont les anneaux de Debye (Figure 35B). C'est l'interprétation de cette image qui permet de retracer le diffractogramme (Figure 35C) qui est constitué d'une suite de pics plus ou moins intenses localisés selon l'angle 2θ (Broll, 1996).

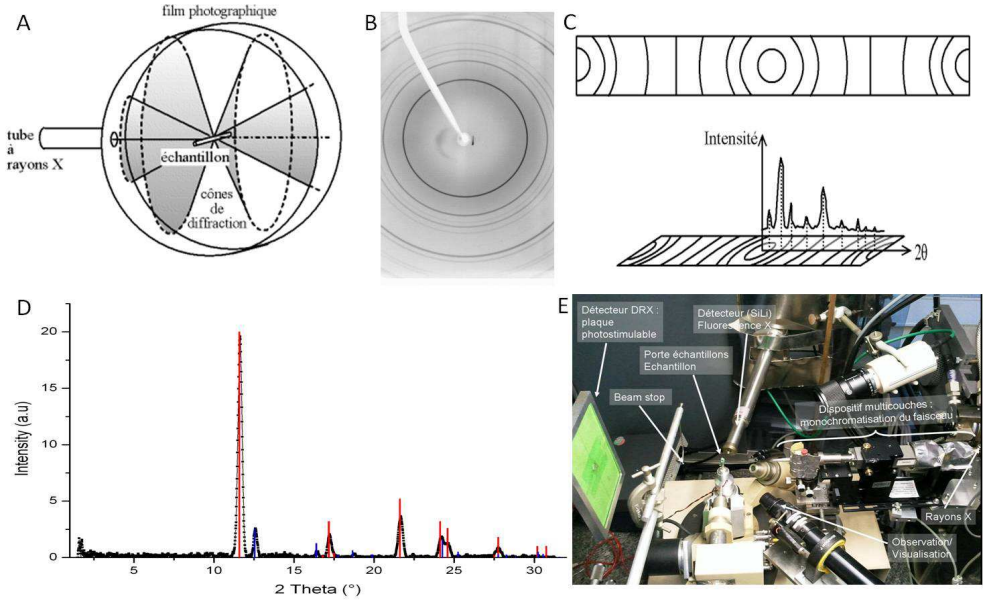


Figure 35 : Diffraction des rayons X. A. Schéma d'une chambre de Debye-Scherrer (anneaux de Debye en pointillés) B. Exemple d'anneaux de Debye imprimés sur la plaque photographique. C. Construction d'un diffractogramme à partir des anneaux de Debye. D. Exemple de la méthode search and match : A25 en mélange de phases anatase (rouge) et rutile (bleu). E. Photo du montage expérimental à anode tournante du SIS2M/LAPA.

Ainsi, chaque composé pur réémet des rayons selon des angles bien précis et compose un diffractogramme distinct. Il existe des banques de données dans lesquelles sont rassemblées les diffractogrammes d'un très grand nombre de composés. La base la plus complète (plus de 150 000 références) est la Powder Diffraction File (PDF). L'identification des composés est réalisée selon la procédure search/match (Figure 35D). Elle est rendue possible grâce à des algorithmes mathématiques qui comparent le diffractogramme expérimental aux diffractogrammes contenus dans la base de données. Le pic le plus intense du diffractogramme a une intensité fixée arbitrairement à 100% et les autres pics sont exprimés en fonction de celui-là. L'intensité du pic représente sa hauteur sur le graphe et est généralement notée I. Les fiches les plus pertinentes sont sélectionnées informatiquement, c'est la phase dite search. Puis l'utilisateur choisit la (si c'est un composé pur) ou les fiches (si c'est un mélange) les plus appropriées selon ses connaissances *a priori* du composé. C'est la phase du match. On accède ainsi aux différents éléments composant l'échantillon ainsi qu'à leurs proportions respectives s'il est en mélange. Un diffractogramme est élucidé quand chaque pic visible correspond à un pic d'une fiche.

Pour l'étude du panel de TiO_2, cette technique a été employée sur l'anode tournante du SIS2M (Figure 35E). Sur ce montage expérimental, un faisceau de rayons X monochromatique de 17,5 keV (Mo, $K_{\alpha1,2}$ – 0,7093 Å) et de 100 µm de diamètre illumine l'échantillon. Le cliché de diffraction est détecté en transmission sur une plaque photosensible (Imaging Plate - IP). L'image latente est ensuite digitalisée à l'aide d'un scanner avec une résolution de 50 x 50 µm².

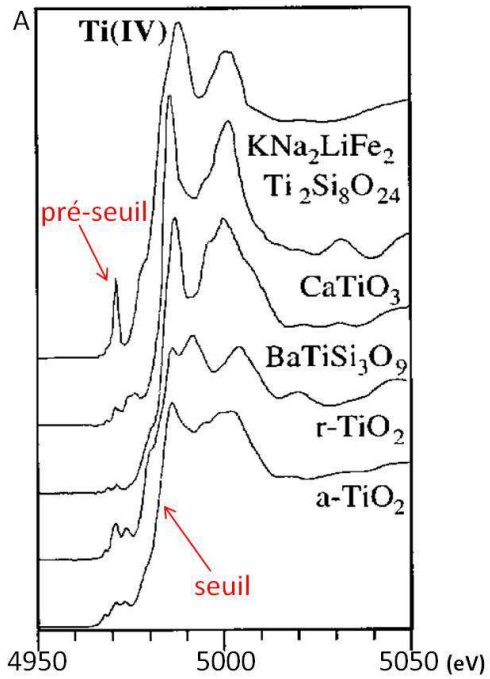
1.2.3. Coordination de l'élément, absorption des rayons X

La coordination du titane a été évaluée sur synchrotron (cf. paragraphe 3.1.2.3) par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS pour X-ray Absorption Spectroscopy). Cette technique fait également partie des techniques qui exploitent le phénomène d'interactions de rayonnement avec la matière (cf. paragraphe 3.1.1). Elle correspond à l'excitation d'un électron de niveau de cœur d'un atome par absorption d'un photon X vers un niveau vide ou vers le continuum (Grossemy, 2008).

Quand l'énergie du photon est suffisante pour exciter un électron d'un niveau profond de l'atome absorbeur tout en restant inférieure à l'énergie d'ionisation, des transitions électroniques se produisent vers les premières orbitales complètement ou partiellement vides. Ceci correspond à la région du **pré-seuil**. Quand le rayonnement X incident correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers le continuum, le coefficient d'absorption augmente brutalement, c'est le **seuil d'absorption**. L'électron est alors diffusé par l'environnement de l'atome absorbeur. On parle de diffusion multiple si l'électron est diffusé par plusieurs atomes voisins et de diffusion simple s'il n'est diffusé que par un seul atome. Quand l'énergie du faisceau incident est à peine supérieure à celle du seuil (jusqu'à 50-100 eV au dessus du seuil), les diffusions multiples sont dominantes, c'est la partie **XANES** (X ray Absorption Near Edge Structure) du spectre (Figure 36A). A des énergies plus élevées (jusqu'à 1000 eV au dessus du seuil), la diffusion simple devient dominante, c'est la partie **EXAFS** (Extended X ray Absorption Fine Structure) du spectre (Doucet and Baruchel, 2011). Dans la zone XANES, les oscillations renseignent sur les liaisons chimiques engagées par l'atome absorbeur, sa géométrie de coordination et son degré d'oxydation. Par exemple, les niveaux de cœur sont stabilisés par l'augmentation du degré d'oxydation de

l'atome. La position du seuil se déplace donc vers les hautes énergies quand le degré d'oxydation augmente (Farges *et al.*, 1997) (Figure 36B). Dans la zone EXAFS, les oscillations renseignent sur le voisinage de l'atome d'intérêt (nombre d'atomes voisins, identification et distance). Un atome isolé aurait une courbe monotone.

A



B

	Ti coordination	Position (ev)
$Ni_{2.6}Ti_{0.7}O_4$	4	4969.6
$Ni_{2.4}Ti_{0.7}Si_{0.05}O_4$	4	4969.5
β-Ba_2TiO_4	4	4969.4
α-Ba_2TiO_4	4	4969.5
$CsAlTiO_4$	4	4969.7
Rb_2TiO_3	4	4969.6
$K_6Ti_2O_7$	4	4969.7
Y_2TiMoO_8	4	4969.9
Na_4TiO_4	4	4969.6
$KNaTiO_3$	5	4970.6
$Ba_2TiSi_2O_8$	5	4970.6
$Sr_2TiSi_2O_8$	5	4970.5
$Ba_2TiGe_2O_8$	5	4970.6
$Na_2Ti_4O_9$	5	4970.5
$K_2Ti_4O_9$	5	4970.6
$Rb_2Ti_4O_9$	5	4970.5
$K_2Ti_2O_5$	5	4970.6
r-TiO_2	6	4971.6
a-TiO_2	6	4971.5
$CaTiO_3$	6	4971.6
$BaTiSi_3O_9$	6	4971.2
$KNa_2LiFe_2Ti_2Si_8O_{24}$	6	4971.1
$FeTiO_3$	6	4971.7
$CaTiSiO_5$	6	4971.4
$TiZrO_4$	6	4971.1
$Ca_3(Ti,Zr)_2(Si,Al_2)O_{12}$	6	4971.2
Error		±0.1

Figure 36 : Spectres XANES. A. Spectre d'absorption du titane selon le composé considéré. B. Energie des seuils d'absorption selon le composé [Farges et al., 1997]

Les analyses de la région du préseuil et de la zone XANES ont été menées sur les nanopoudres de TiO_2 ainsi que, *in situ*, dans des zones concentrées en titane, repérées dans les échantillons végétaux par microfluorescence X. Le balayage en énergie a été réalisé autour du seuil du titane (4966 eV), typiquement entre 4950 et 5015 eV (pas de 0,5 eV). Ces analyses ont été menées sur les lignes de lumière LUCIA (SOLEIL) et ID21 (ESRF). L'analyse des spectres a été réalisée par M. Carrière.

Plusieurs étapes permettent l'analyse des spectres obtenus. Tout d'abord, la série de spectres obtenus sur un même échantillon est moyennée. En général, 5 à 10 spectres sont enregistrés sur la même zone, leur nombre dépend de la statistique de la mesure et donc de la concentration en titane de la zone sondée. Ce spectre moyen est ensuite redressé et normalisé grâce au logiciel Athena, basé sur le code Iffefit (Ravel and Newville, 2005). Cette première étape permet d'obtenir des spectres dans lesquels le saut d'absorbance entre la zone du préseuil et la zone après seuil est de 1. Les spectres sont alors comparables entre eux. Le traitement des régions de pré-seuil a été effectué grâce au logiciel Fytik (Wojdyr, 2010). La ligne de base de cette zone est ajustée à l'aide d'une fonction arctangente. Puis les 3 pics qui constituent cette région sont déconvolués : ils sont ajustés à l'aide de trois (ou quatre dans le cas des particules anatases) gaussiennes. Dans le cas des particules anatase, la position de ces gaussiennes a été fixée. Dans le cas des particules rutiles, seules les positions de la première et de la troisième gaussienne ont été fixées, car la position de la deuxième gaussienne dépend de la taille de la particule. L'aire sous chacune de ces gaussiennes a ainsi été mesurée.

1.3. Mise en suspension des nanopoudres

En vue de leur utilisation pour les tests biologiques, les nanomatériaux sont mis en suspension dans de l'eau ultrapure (pH 5,5). Les suspensions mères sont toujours préparées dans les mêmes conditions. Pour les TiO_2, la concentration de la suspension mère est de 10 mg/mL et le volume 10 mL. Pour les NTC, la concentration est de 1 mg/mL et le volume 10 mL. Ces suspensions sont préparées dans des tubes de 15 mL. La dispersion des particules dans l'eau est réalisée grâce à des ultrasons qui vont briser les liaisons faibles entre les particules. Pour cela, on utilise un sonificateur à ultra haute puissance équipé d'une microsonde conique en titane de 13 mm qui plonge dans la suspension (Autotune 750 W ; Fischer Scientific Bioblock) (Figure 37A). Pour éviter tout risque de surchauffe de la suspension, le système (tube + sonde) est placé dans un bain glacé.

Les conditions optimales de sonification ont été déterminées précédemment (Simon-Deckers, 2008) pour obtenir des suspensions les mieux dispersées possibles. Ainsi, les TiO_2 sont sonifiées pendant 1h à une puissance de 28% sur le mode une seconde de pulse, une seconde de repos pour limiter l'échauffement. Les NTC sont sonifiés pendant 16h selon les mêmes conditions, avec un ajout de 0,25% (vol.) de gomme arabique comme dispersant. La sonification des nanotubes est plus longue car ces derniers se présentent sous forme de tapis. Il faut donc, dans un premier temps, briser le tapis puis séparer les tubes individuellement (Figure 37B).

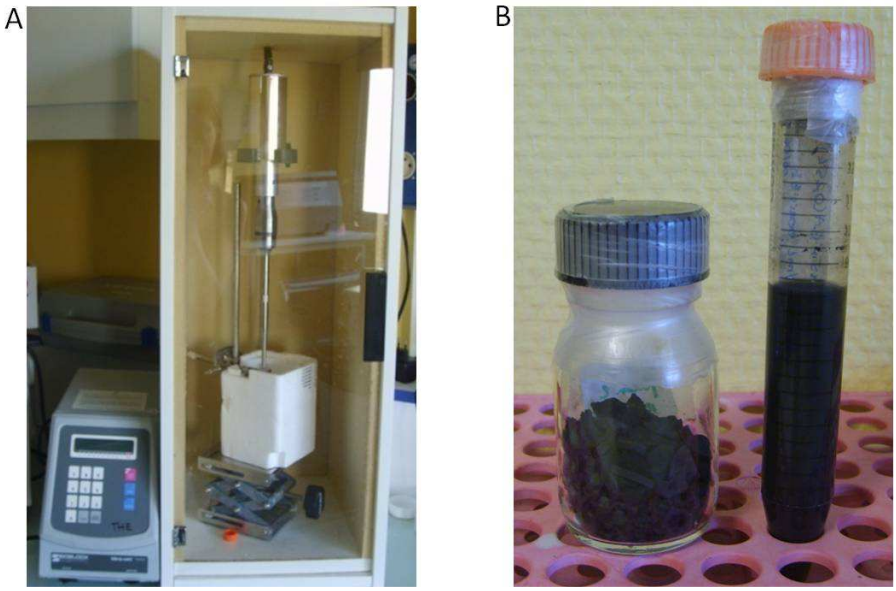


Figure 37 : A. Installation pour la sonification des nanomatériaux : un générateur, un caisson d'insonorisation, la microsonde conique et le bac de réfrigération. B. Présentation des NTC sous forme de tapis (à gauche) puis en suspension (à droite).

Pour une meilleure dispersion, l'ajout d'agents dispersants a également été envisagé. Après divers essais, la gomme arabique (GA) et les acides humiques (AH) à 0,25% ont été retenus pour les NTC. Pour les TiO_2, aucun produit n'a pu améliorer la dispersion des particules, ces particules ont donc été utilisées telles quelles.

1.4. Analyse des suspensions de nanomatériaux

1.4.1. Charge de surface ou potentiel zeta

Le potentiel zeta est une indication de la charge de surface des particules. Il renseigne donc indirectement sur la probabilité d'interactions entre les particules et *a posteriori* sur la stabilité de la suspension. Le potentiel zeta (aussi noté potentiel ζ) représente la charge qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. Le potentiel zeta est mesuré au niveau du plan de cisaillement de la particule, c'est-à-dire à la limite entre la partie de la solution qui se déplace avec la particule et le reste de la solution. Il englobe donc la particule et sa double couche électrique composée de la couche dite de Stern qui contient les ions fortement liés à la surface de la particule et la couche diffuse ou couche de Gouy qui contient les ions moins fortement liés. Le potentiel zeta correspond à la différence de charge entre un point pris au cœur de la solution (où le potentiel est nul) et ce plan de cisaillement (Figure 38) (www.malverninstruments.fr).

Plus le potentiel est élevé en valeur absolue, plus les particules se repoussent et la solution est stable. A l'inverse, plus le potentiel est proche de zéro, plus les particules ont tendance à s'agglomérer. Expérimentalement, il est observé qu'entre -30 mV et +30 mV, les particules ont tendance à s'agglomérer (Bratby, 2006).

Le potentiel zeta d'une particule en suspension n'est pas fixe. Il présente la particularité de varier en fonction de la solution environnante. Ainsi, il est fortement influencé par le pH de la solution et la charge ionique. Il existe un pH pour lequel le potentiel zeta est nul, on l'appelle alors point de charge nulle ou point isoélectrique (pI).

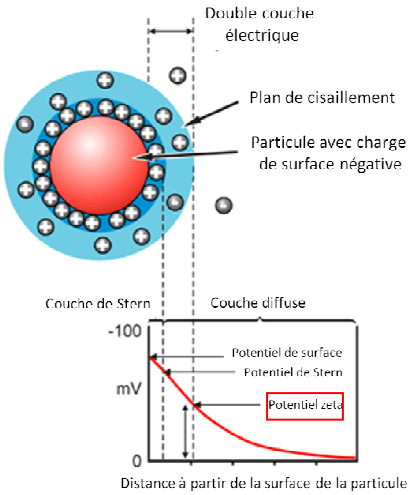


Figure 38 : Point de mesure du potentiel zeta d'une particule [www.malvern.com]

Ce potentiel est mesuré par la technique de l'électrophorèse laser doppler (ELD). Une tension électrique est appliquée à la suspension dans la cellule de mesure grâce à deux électrodes. Les particules migrent vers les électrodes selon leur charge et avec une vitesse proportionnelle à la valeur de leur potentiel zeta. La vitesse des particules est évaluée en fonction de la fluctuation temporelle de l'intensité lumineuse diffusée par les particules en mouvement (Lazare and Mottay, 2007).

Les mesures sont réalisées sur le Zetasizer 3000 HS couplé au titrateur MPT1 (Malvern) du Laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay. Les mesures de potentiel zeta ont été réalisées sur des suspensions à 50 mg/L.

1.4.2. Diamètre hydrodynamique et état d'agglomération

Le diamètre hydrodynamique de particules en suspension est mesuré par diffusion dynamique de la lumière (ou DLS pour Dynamic Light Scattering) aussi appelée diffusion quasi élastique de la lumière (ou QLES pour Quasi Elastic Light Scaterring) ou encore spectroscopie par corrélation de photon (ou PCS pour Photon Correlation Spectroscopy).

Le diamètre hydrodynamique est le diamètre d'une sphère et des ions et molécules qui bougent avec elle dans la solution c'est-à-dire la première sphère d'hydratation (Figure 39A). Le diamètre hydrodynamique renseigne de manière indirecte sur l'état d'agglomération des NPs en suspension.

En pratique, la mesure est basée sur l'enregistrement des mouvements browniens des particules en suspension. Le mouvement brownien est le mouvement aléatoire d'une particule sous l'impact des molécules du solvant sur sa surface. Ce mouvement est d'autant plus important (en fréquence et en amplitude) que la particule est petite et le solvant peu visqueux (Figure 39B) (Brar and Verma, 2011; www.malvern.com).

Sous l'impact d'un faisceau laser, les particules en suspension dans une cellule de mesure diffusent la lumière dans toutes les directions de l'espace avec une intensité spécifique selon leurs mouvements browniens. Ces fluctuations d'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps sont captées par un photomultiplicateur. Le signal reçu est transformé en fonction d'auto-corrélation par un corrélateur numérique. Cette fonction représente la probabilité de retrouver une particule donnée au même endroit à t et à t+τ.

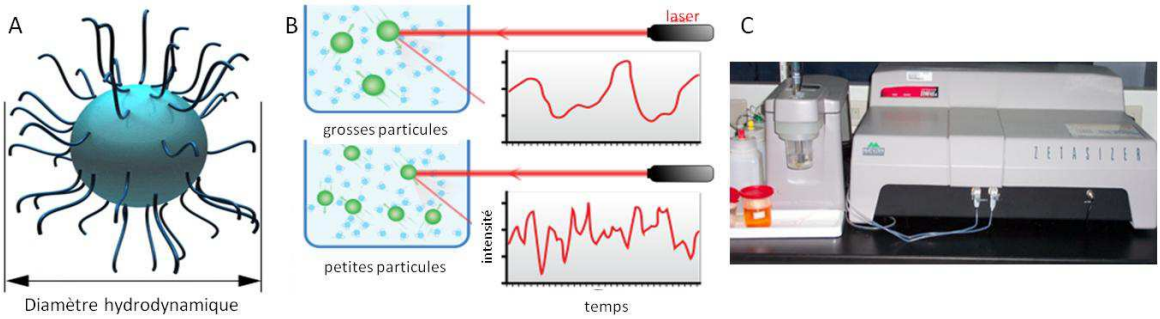


Figure 39 : A. Schéma d'interprétation du diamètre hydrodynamique d'une particule [www.malvern.com]. B. Illustration de mouvements browniens de particules en suspension [en.wikipedia.org]. C. Zetasizer 3000 HS du Laboratoire Francis Perrin

Différents traitements mathématiques permettent de déterminer, à partir de cette fonction, le coefficient de diffusion translationnelle D (Brar and Verma, 2011). Et à partir de ce coefficient, par la relation de Stokes-Einstein, on en déduit le diamètre hydrodynamique selon :

$$D = \frac{K\,T}{6\,\pi\,\eta\,a}$$

Avec D, coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$)

K, constante de Boltzman ($1{,}380 \times 10^{-23}$ $J.K^{-1}$)

T, température absolue (K)

η, viscosité du solvant (Pa.s)

a, rayon hydrodynamique (m)

Le traitement mathématique du signal est spécifique au constructeur de l'appareil. Les résultats obtenus sur des appareils différents ne sont donc pas forcément directement comparables.

Les mesures ont été réalisées sur le Zetasizer 3000 HS (Malvern) du Laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay (Figure 39C). Cet appareil s'appuie sur des algorithmes qui limitent les mesures aux particules sphériques avec des tailles inférieures au micron.

2. Modèles biologiques, conditions de culture et d'exposition

2.1. Espèces végétales

Pour cette étude, deux espèces végétales ont été choisies pour leur intérêt agronomique. De plus, le choix s'est porté sur des membres représentatifs de chacune des deux catégories d'angiospermes (plantes à fleurs) : le blé pour les monocotylédones et le colza pour les dicotylédones.

2.1.1. Monocotylédones/dicotylédones

Les végétaux supérieurs ont une organisation structurelle commune. Ils sont constitués d'une partie souterraine, les racines et d'une partie aérienne, les feuilles. Entre les deux se trouve la tige.
Les racines (Figure 40A) sont le siège des échanges de la plante avec le sol. Elles constituent donc une surface d'échanges avec l'environnement. Les racines sont organisées en trois principaux éléments (Figure 40B) : un tissu de protection : l'épiderme, un tissu de réserve : le parenchyme ou cortex et un tissu conducteur : le cylindre central ou stèle qui contient les différents éléments de transport du xylème (sève brute) et du phloème (sève élaborée). A l'interface du parenchyme et du cylindre central se trouve une couche de cellules appelée endoderme dont une partie de la paroi est épaissie et suberifiée la rendant imperméable, c'est le cadre de Caspary. Cet élément est à l'origine du contrôle du flux hydrominéral en provenance du milieu extérieur vers le reste du végétal.

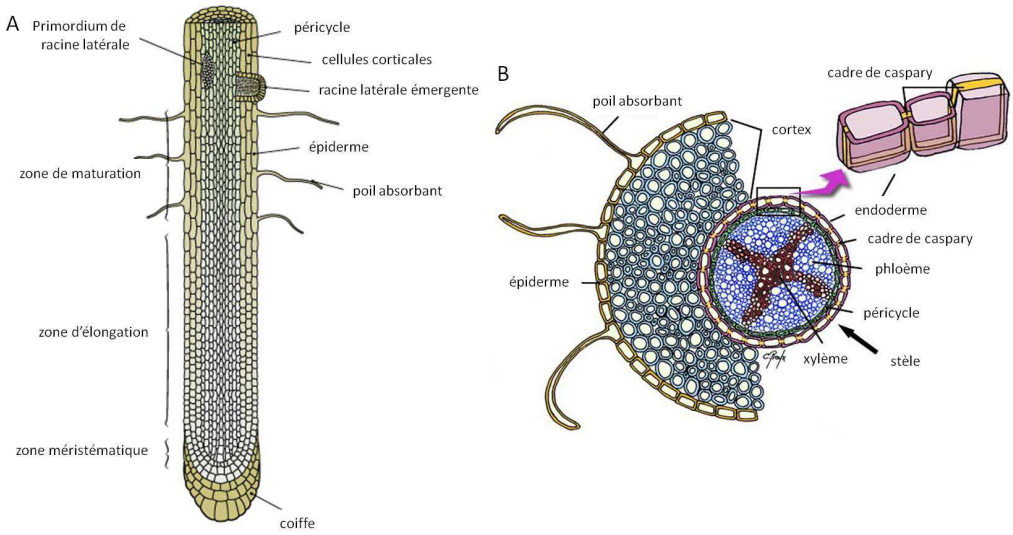


Figure 40 : Les racines. A. Coupe longitudinale d'une racine [www.afd-ld.or] B. Coupe transversale de racine [www.colvir.net]

En effet, les flux hydrominéraux en provenance du milieu extérieur pénètrent dans la racine, principalement par les poils absorbants et se déplacent de façon radiale par différence de potentiels hydriques et grâce à des transporteurs membranaires pour atteindre le cylindre central et les vaisseaux du xylème. Ce transport peut s'effectuer selon deux voies (Figure 41) : la voie symplasmique ou la voie apoplasmique.

La voie symplasmique passe par l'intérieur des cellules. Le flux traverse les membranes plasmiques des cellules et migre d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes jusqu'au cadre de Caspary. La voie apoplasmique, à l'inverse, est constituée de tous les espaces intercellulaires : méats et parois. Cette voie est stoppée par le cadre de Caspary, hautement hydrophobe, et rejoint alors la voie symplasmique pour traverser l'obstacle. Les flux sont alors pris en charge par les éléments conducteurs et transférés vers les parties aériennes : les feuilles.

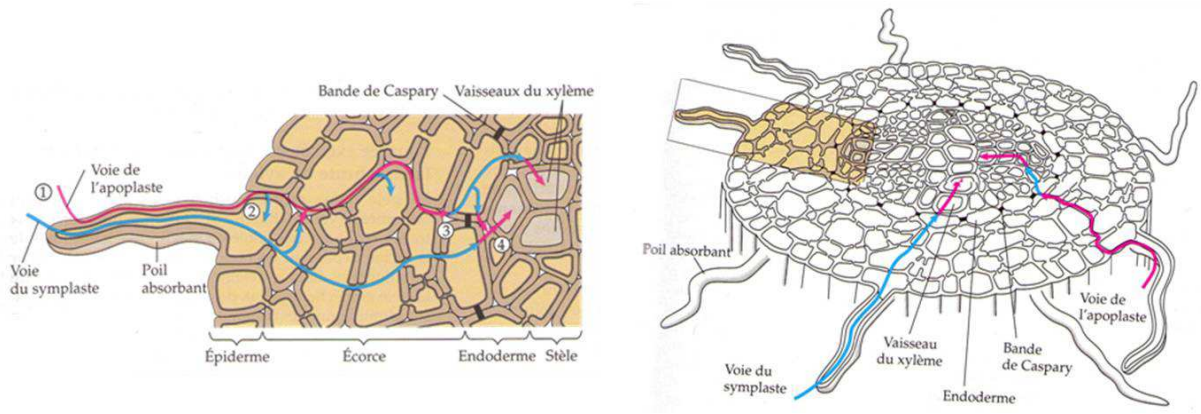


Figure 41 : Les deux voies de transport de l'eau et des minéraux dans les racines : le symplasme (bleu) et l'apoplasme (rouge) [Campbell, 1995]

Les éléments nutritifs sont conduits par le flux ascendant de sève brute vers les feuilles (Figure 42) qui représentent la surface d'échanges du végétal avec l'air. L'ascension est régulée par le phénomène d'évapotranspiration. Les feuilles sont protégées de l'environnement extérieur par une

fine couche appelée cuticule déposée sur l'épiderme. La cuticule est percée de stomates qui contrôlent les échanges gazeux du végétal avec le milieu extérieur.
Entre les deux épidermes se trouvent deux tissus parenchymateux constitués de cellules chlorophylliennes : le parenchyme palissadique très bien organisé sur la face supérieure et le parenchyme lacuneux vers la face inférieure. Ces deux tissus constituent le mésophylle, c'est le siège de la photosynthèse.

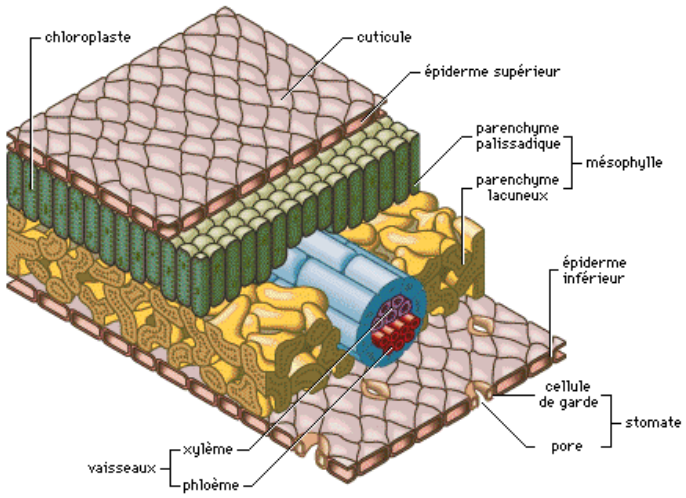


Figure 42 : Constitution d'une feuille [www.voyagesphotosmanu.com]

Au-delà de ces éléments d'organisation commune, ils existent des différences notables entre les monocotylédones et les dicotylédones. Elles se trouvent résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principales différences entre les monocotylédones et les dicotylédones

Monocotylédones (au moins 65 000 espèces)	Dicotylédones (au moins 170 000 espèces)
Embryon à un seul cotylédon	Embryon à deux cotylédons
Cotylédon = première feuille	Cotylédons très différents des feuilles
Graine contient l'endosperme	Endosperme a été absorbé par les cotylédons
Herbacées	Herbacées ou ligneuses
Pollen à un seul sillon ou pore	Pollen à trois sillons ou pores
Pièces florales selon un multiple de 3	Pièces florales selon un multiple de 4 ou 5
Feuilles longues et étroites	Feuilles grandes aux formes variées + pétiole
Nervures principales parallèles	Nervures réticulées
Stomates sur les deux faces de la feuille	Stomates seulement sur la face inférieure
Faisceaux vasculaires dispersés dans la tige	Faisceaux vasculaires arrangés en cercle
Tige unique non ramifiée	Tige ramifiée
Pas de croissance secondaire (pas cambium)	Croissance secondaire possible (cambium)
Système racinaire fasciculé et superficiel	Système racinaire pivotant

Néanmoins, ces différences à elles seules ne permettent pas de classer une espèce avec certitude, il existe de nombreuses exceptions.

2.1.2. Le blé

Le blé tendre ou *Triticum aestivum* (Figure 43) est une plante annuelle de la famille des Poacées. Cette céréale est cultivée dans de très nombreux pays et se classe au quatrième rang des espèces cultivées dans le monde avec une production annuelle de 660 millions de tonnes en 2010 (www.fao.org) soit environ 100 kg/personne pour l'ensemble de la population mondiale. L'Europe à 27 est le premier producteur mondial (143 millions de tonnes). Elle représente également la céréale la plus échangée sur le marché mondial (127 millions de tonnes). En France, le blé est la céréale la plus cultivée avec une superficie de plus de 5 millions d'hectares et une production de plus de 38 millions de tonnes, classant le pays au 5ème rang mondial des producteurs avec 5,6% de la production mondiale.

Les premières cultures de blé datent du VIIIème millénaire av. JC en Mésopotamie. Cette céréale a été domestiquée au Proche Orient à partir de l'espèce sauvage égilope. Aujourd'hui, le blé constitue un élément essentiel de la consommation alimentaire humaine dans la civilisation occidentale et au Moyen-Orient. Le débouché du blé est donc principalement l'alimentation humaine (58%) puis l'alimentation animale (34%). Les 8% restants représentent les usages industriels (amidonnerie, glutennerie et biocarburants). Le blé tendre est notamment transformé en farine panifiable pour être inclus dans l'élaboration du pain. Le blé dur, qui constitue une autre espèce, est quant à lui employé dans la confection des pâtes et semoules (ITCF and ADEME, 1998).

Le blé est une plante herbacée monocotylédone à feuilles alternes, formée d'un chaume portant un épi constitué de deux rangées d'épillets. Le grain de blé contient l'embryon à un cotylédon et des réserves sous forme d'albumen composé à 70% d'amidon et 15% de gluten.

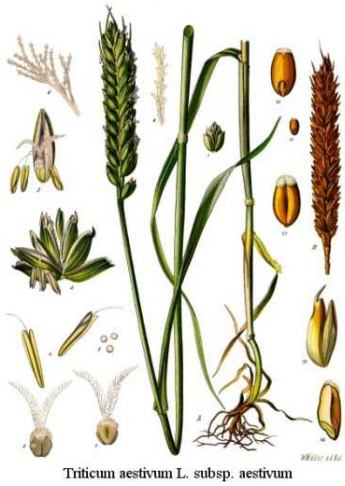


Figure 43 : Planche botanique du blé tendre (*Triticum aestivum*)

La germination est uniquement déterminée par une somme de température de 30°C en base 0°C. Il s'agit de la température moyenne quotidienne cumulée. Ainsi, un grain de blé peut germer après trois jours à 10°C ou 10 jours à 3°C. Pour la levée, il faut compter 150°C puis environ 100°C entre chaque nouvelle apparition de feuille (Abrol and Ingram, 1995).

Les expériences sont menées sur des plantules de 0 à 3 semaines, soit jusqu'au stade 3 feuilles dans nos conditions de culture.

2.1.3. Le colza

Le colza ou *Brassica napus* (Figure 44) est une plante annuelle à fleurs jaunes de la famille des Brassicacées. Le colza est une culture largement répandue dans le monde dans les zones tempérées fraîches avec une production mondiale annuelle de 58,2 millions de tonnes en 2010 (www.fao.org). L'Union Européenne représente 34,8% de cette production et se classe ainsi comme premier producteur mondial devant la Chine. L'échange du colza sur le marché mondial représente 6,4 millions de tonnes. En France, la superficie de colza s'élève à 1,5 million d'hectares pour 4,8 millions de tonnes (5ème rang mondial) dont 65% sont destinées à la production de biocarburants, le reste à des usages alimentaires. Les usages alimentaires se divisent en deux principales catégories : alimentation humaine et alimentation animale. Le colza permet la production d'huile pour l'alimentation humaine. En effet, les graines de colza contiennent environ 40% d'huile. Le co-produit des deux précédentes filières (biocarburants et alimentation humaine) est réutilisé pour l'alimentation animale sous forme de tourteaux qui représentent un apport protéiné intéressant pour le bétail (www.cetiom.fr, 2011).

La culture du colza remonte à 2000 à 1500 av. JC. Il est issu du croisement entre le chou et la navette.

Le colza est une plante herbacée à fleurs jaunes en grappe de la famille des dicotylédones. Ses fruits sont des siliques renfermant de petites graines riches en lipides.



Figure 44 : Planche botanique du colza (*Brassica napus*)

En France, le colza est semé en fin d'été (entre le 15 août et le 15 septembre) et atteint le stade rosette en fin d'automne. C'est sous cette forme de rosette d'une vingtaine de feuilles qu'il passera l'hiver pour reprendre sa croissance au printemps. La floraison commence alors que la montaison n'est pas terminée et s'étale sur une période de plus d'un mois (Abrol and Ingram, 1995).

Les expériences sont menées sur des plantules de 0 à 3 semaines, soit jusqu'au stade cotylédons + 2 feuilles dans nos conditions de culture.

2.2. Conditions de culture

Les semences utilisées dans les tests proviennent de différentes sources. Le blé a été fourni par AgriObtention (Guyancourt, 78). Il s'agit de la variété Courtot qui est un blé tendre d'hiver (majorité des surfaces de blé). Le lot est de 3 kg, non traité et le poids de mille grains (PMG) de 43 g. Le colza (*Brassica napus* vs. KALIF) a gracieusement été fourni par Gilles Renart (Agralys Bio Sica, 41).

Les semences sont conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'au moment de l'expérience. Cette conservation permet une stratification des graines et donc une synchronisation des germinations pour obtenir des plantules d'âge homogène. Juste avant chaque expérience, les graines sont stérilisées à l'aide d'hypochlorite de sodium à 2,5 % pendant 5 min puis rincées deux fois à l'eau distillée.

Les plantules sont cultivées en conditions contrôlées dans un phytotron (Cryonext RTH 600) avec un cycle jour/nuit de 16h/8h, une intensité lumineuse de 100 µmoles/m²/s, des températures de 24/20°C et une humidité de 70/74%, respectivement.

2.3. Conditions d'exposition

Pendant les tests, les expositions ont été de plusieurs types : racinaire en hydroponie, aérienne en hydroponie et racinaire sur sol.

2.3.1. Exposition racinaire en hydroponie

Dans un premier temps, les graines sont amenées à germer sur du sable. Ce sable est régulièrement arrosé avec du milieu de culture de Hoagland modifié et stérilisé, de force ionique 1/2 à pH 5,5 dont la composition suit (ce milieu sera appelé Hoagland par la suite) : $MgSO_4.7H_2O$ (0,5 mM), $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (2,5 mM), KH_2PO_4 (0,5 mM), KCl (2,5 mM) ainsi que les microéléments H_3BO_3 (25 µM), $MnSO_4.4H_2O$ (5 µM), $ZnSO_4.4H_2O$ (0,4 µM), $CuSO_4.5H_2O$ (0,2 µM), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0,25µM) et EDTA Fe-Na (4 µM). Après 15 jours, les jeunes plantules sont transférées individuellement dans des tubes de 15 mL pour poursuivre leur croissance. Les bouchons de ces tubes sont perforés pour permettre l'insertion de la plantule et le tube est recouvert d'aluminium pour protéger les racines de la lumière (Figure 45). Ce système permet d'éviter toute contamination des parties aériennes par la suspension de nanomatériaux. Ces plantules sont exposées aux NPs mises en suspension soit dans de l'eau ultrapure soit dans du Hoagland. Pour éviter tout endommagement des racines, les milieux ne sont pas agités pendant la durée de l'exposition qui est de 7 jours.

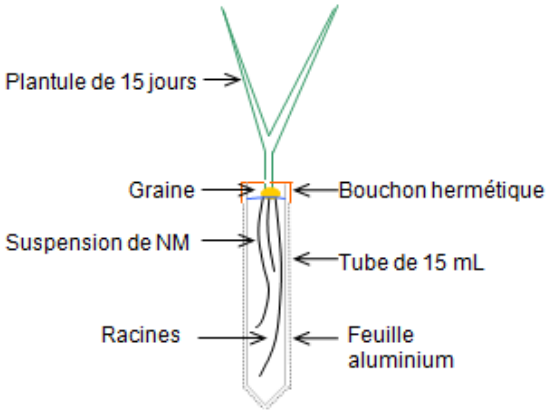


Figure 45 : Dispositif expérimental d'exposition des plantules en hydroponie (*NM. nanomatériaux*)

2.3.2. Exposition aérienne

Une exposition aérienne des feuilles de colza a été réalisée pour évaluer la possibilité d'internalisation des NPs en cas de pollution atmosphérique. Les plantules sont alors cultivées en hydroponie et l'exposition a mimé un dépôt humide.
Ainsi, une feuille de colza a été immergée pendant 7 jours dans une suspension de NPs de TiO_2 à 100 mg/L. A la fin de l'exposition, la répartition du titane dans la feuille exposée et dans les feuilles néoformées pendant le temps de l'exposition a été analysée.

2.3.3. Exposition racinaire sur sol

Pour se rapprocher des conditions environnementales, les plantules ont été exposées à des sols expérimentalement contaminés par des NPs. Plusieurs types de sols ont été sélectionnés pour évaluer l'importance des caractéristiques physico-chimiques de ces sols sur la biodisponibilité des nanomatériaux. Ces substrats sont des sols commerciaux utilisés par la communauté scientifique et bien caractérisés (Tableau 5). Ce sont des sols agricoles dont on connait l'historique de culture et de fertilisation. Ils sont commercialisés par la société LUFA (Allemagne).

Après réception, les sols sont stockés dans une étuve à 40°C jusqu'au début de l'expérience. Avant l'exposition, les sols sont contaminés avec des suspensions de NPs. Pour cela, 15 g de sol et 15 mL d'une suspension de NPs de TiO_2 (A25) à 100 mg/L sont insérés dans un tube qui est agité pendant 48h à l'obscurité. Les sols dits « témoins » subissent le même traitement avec de l'eau ultrapure. Le contenu des tubes est ensuite versé dans une seringue de 22 mL dont l'embout est préalablement obstrué par un coton humidifié. Les sols vont ainsi ressuyer pendant 48h. Le lixiviat en sortie de seringue est récolté pour être ensuite analysé par ICP-MS. Les graines sont mises à germer et sont cultivées sur ces sols durant 3 semaines.

Les plantules exposées sur sol ont uniquement fait l'objet d'une étude de répartition et de quantification des NPs de TiO_2.

Tableau 5 : Caractéristiques des sols utilisés (*n.r. non renseigné*)

	Sable	**Sol 2.1**	**Sol 2.2**	**Sol 6S**
Carbone organique (%)	n.r.	0,74 ± 0,14	2,09 ± 0,40	1,69 ± 0,17
pH	n.r.	5,1 ± 0,5	5,5 ± 0,1	7,2 ± 0,1
CEC (meq/100g)	n.r.	4,0 ± 1,0	10,0 ± 0,5	22,0 ± 6,0
Capacité de rétention en eau (g/100g)	n.r.	31,8 ± 3,0	46,5 ± 6,0	39,6 ± 5,0
Masse volumique (g/1000 mL)	2600	1430 ± 57	1220 ± 78	1330 ± 96
Taille des particules selon la DIN (%)				
<0,002 mm	0	2,8 ± 0,8	6,4 ± 0,9	41,9 ± 1,5
0,002 – 0,006 mm	0	2,1 ± 0,8	3,0 ± 0,6	10,5 ± 0,9
0,006 – 0,02 mm	0	3,0 ± 0,7	4,0 ± 0,6	12,2 ± 1,4
0,02 – 0,063 mm	0	5,8 ± 1,5	5,8 ± 1,1	14,3 ± 2,3
0,063 – 0,2 mm	0	27,2 ± 3,0	35,5 ± 2,2	8,9 ± 0,7
0,2 – 0,63 mm	60	56,6 ± 3,9	44,5 ± 2,6	8,9 ± 0,4
0,63 – 2,0 mm	40	2,5 ± 0,6	0,7 ± 0,2	3,3 ± 0,8
Type de sol	Sable	Sable limoneux	Sable loameux	Loam argileux

3. Analyse de la répartition et de l'accumulation des nanomatériaux dans les végétaux

Après une période d'exposition de 7 jours aux nanomatériaux (ou 21 jours lorsque l'exposition a lieu sur sol), les plantules de blé et de colza sont analysées pour déterminer si les nanomatériaux ont pénétré dans les racines et migré vers les feuilles. Dans ce but, différentes méthodes ont été utilisées en fonction des nanomatériaux (TiO_2 ou NTC).

3.1. Techniques basées sur les interactions rayonnement-matière

3.1.1. Principes des interactions rayonnement-matière

Ce paragraphe a pour objet de présenter les principales interactions existant entre un rayonnement et la matière puisque la plupart des techniques présentées par la suite s'appuie sur ces principes physiques. Le rayonnement peut être de plusieurs natures : électrons, ions (protons) ou encore photons. Ce rayonnement peut entrer en interaction avec le noyau de l'atome ou bien avec le cortège électronique. Enfin, l'interaction peut être soit élastique (conservation de l'énergie cinétique) soit inélastique (une partie de l'énergie cinétique du rayonnement est cédée à l'atome). Ces différentes composantes permettent d'avoir accès à de nombreuses informations sur la matière analysée (Doucet and Baruchel, 2011).

Les atomes sont composés d'un noyau et d'un cortège d'électrons gravitant autour de ce noyau. Les électrons se répartissent selon différentes orbitales (nommées K, L, M et N), dont les différentes formes (s, p, d) correspondent à des distributions de probabilité pour la position de l'électron autour du noyau. Le remplissage des orbitales atomiques et la forme du nuage électronique obéissent aux

mêmes règles pour tous les atomes (Figure 46A). Ces règles appliquées à l'atome de titane donnent la configuration décrite dans la Figure 46B.

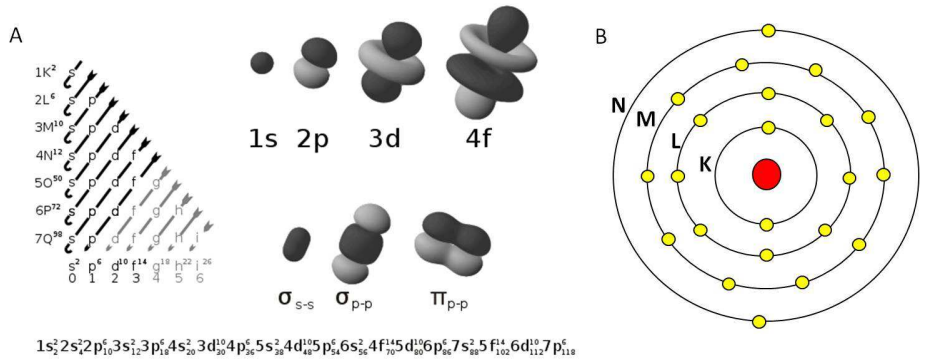


Figure 46 : A. Règles de remplissage des orbitales atomiques et forme du nuage électronique correspondant. B. Modèle de l'atome de titane de formule $1s^2\ 2s^2\ 2p^6\ 3s^2\ 3p^6\ 3d^2\ 4s^2$

Quand un rayonnement, quel qu'il soit, rencontre un atome il subit différentes interactions (Doucet and Baruchel, 2011) :

1. - il peut interagir de manière **inélastique** avec les **électrons** qui entourent le noyau. Si le rayonnement est suffisamment énergétique, il peut éjecter un électron de sa couche vers l'extérieur, c'est ce qu'on appelle une ionisation. Cet électron éjecté vers le milieu est appelé électron secondaire (
2. Figure 47A). Chaque élément incident (électron, proton ou photon) peut générer un ou plusieurs électrons secondaires. Quand les électrons secondaires possèdent une faible énergie et proviennent des couches superficielles de l'échantillon (<10 nm), comme dans le cas du MEB où le rayonnement est un faisceau d'électrons, ils sont très sensibles aux variations de relief de l'échantillon. La moindre variation va modifier la quantité d'électrons reçue par le détecteur. Ainsi, les pentes bien orientées par rapport au détecteur paraitront plus lumineuses alors que celles qui envoient leurs électrons secondaires du côté opposé à celui du détecteur paraitront sombres. Ces électrons secondaires renseignent sur la topographie de l'échantillon en MEB.
3. Lors de ce processus, la place laissée vacante par l'électron secondaire (lacune électronique) sur son orbitale atomique est comblée par un électron de l'orbitale atomique plus externe. La différence d'énergie entre ces deux couches va provoquer l'émission de rayons X (
4. Figure 47B). C'est l'étape de désexcitation qui suit l'ionisation de l'atome. L'énergie de réémission de ces rayons X est spécifique de l'atome considéré. Ils permettent de faire des analyses chimiques en EDS, en XRF et en PIXE.

- le rayonnement peut également interagir avec le **noyau de l'atome**, de manière **élastique**. Le rayonnement incident est alors réémis vers le milieu extérieur avec la même énergie cinétique qu'il avait avant l'interaction, subissant uniquement un changement de trajectoire (Figure 47C). Dans le cas d'un rayon incident composé d'électrons comme en MEB, on parle d'électrons rétrodiffusés. Grâce à leur énergie élevée, ils peuvent provenir d'une profondeur plus importante que les électrons secondaires. De plus, ces électrons sont sensibles au numéro atomique des atomes. Ainsi, un élément lourd renverra plus d'électrons rétrodiffusés qu'un élément léger et la zone contenant ces

éléments lourds apparaitra plus brillante. C'est ce qui permet de repérer le titane dans nos échantillons en MEB car il est plus lourd que les autres atomes constituant la matière végétale (C, H, O, N). Dans le cas de la microsonde nucléaire, le faisceau incident est composé d'ions et plus précisément de protons. Ce sont alors les protons qui entrent en collision avec le noyau de l'atome et qui sont réémis. C'est le principe de la méthode RBS qui permet d'évaluer la teneur en éléments légers de l'échantillon.

- enfin quand l'échantillon est extrêmement fin, le rayonnement incident peut le traverser et être recueilli de l'autre côté. C'est la **transmission** du rayonnement. Plus l'échantillon est dense, moins le faisceau passera et plus la zone correspondante sur l'image sera sombre. C'est le principe du MET ou du STIM.

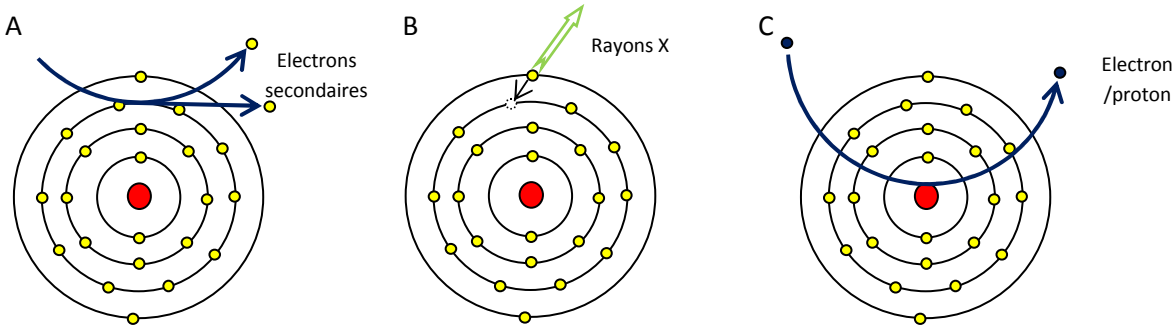


Figure 47 : Principales interactions rayonnement-matière possibles: A. Electrons secondaires. B. Rayons X. C. Electron rétrodiffusé

3.1.2. Techniques utilisées

3.1.2.1. Microscopie Electronique à Transmission

Les microscopes électroniques ont été développés à partir des microscopes optiques et ont pour objectif d'atteindre une meilleure résolution spatiale. En effet, en microscopie optique, la résolution (environ 200 nm) est limitée par la longueur d'onde des photons émis. Les électrons possédant une longueur d'onde beaucoup plus faible, la microscopie électronique permet d'atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre.

Le microscope électronique à transmission (MET) a été mis au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska, ce qui leur valu, en 1986, le prix Nobel de physique.

Au sommet de la colonne (Figure 48A), un flux d'électrons est généré par un canon à électrons (filament de tungstène). Ce flux est ensuite accéléré par différence de potentiel puis focalisé par différentes lentilles magnétiques. Ce faisceau est « transmis » à travers un échantillon mince et vient former son image sur un écran fluorescent sous l'échantillon. Le contraste spatial provient de différences d'épaisseur, de densité et de composition chimique au sein de l'échantillon. Ainsi, les zones denses laissent passer peu d'électrons et apparaissent sombres sur l'image formée. A l'inverse, des zones peu denses apparaissent en clair. De la même façon, les éléments lourds apparaissent plus sombres que les éléments légers. Ces images sont ensuite visualisées grâce à une caméra numérique qui permet également l'acquisition des clichés en MET (Paqueton and Ruste, 2006; Garaud and

Roussel, 2011). Ce type d'appareil permet d'atteindre une résolution spatiale inférieure à 0,1 nm (grossissement allant jusqu'à 180 000 fois).

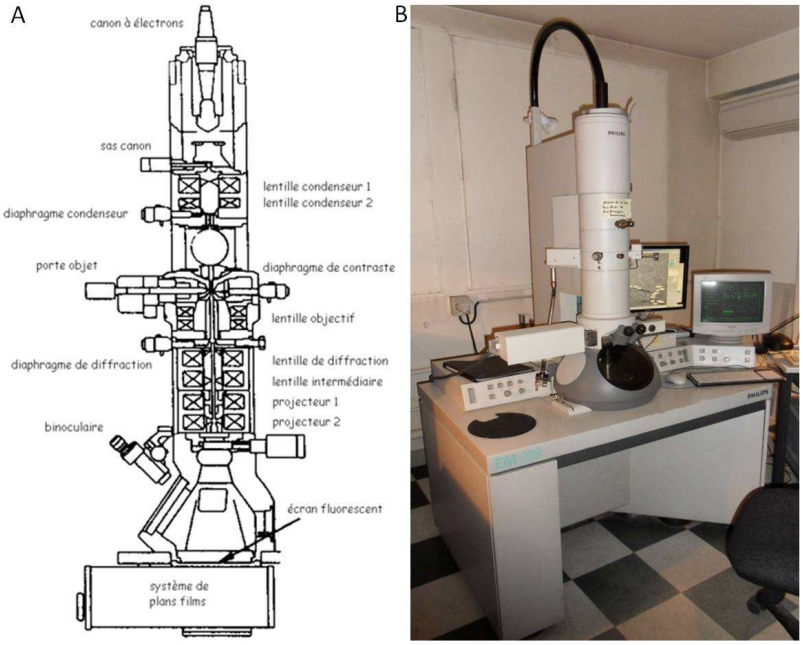


Figure 48 : Microscope électronique à transmission. A. Schéma d'un MET [fr.wikipedia.org] B. Photo du MET du CCME d'Orsay : Darwin

Dans le cadre de cette étude, la préparation des échantillons et les observations ont été réalisées au Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay (UMR 8080) avec l'aide de Danielle Jaillard. Les clichés ont été pris sur un MET Philips EM 208 (Figure 48B) équipé d'une caméra numérique à bas niveau de lumière (AMT Advantage HR3 ; capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024x1024) pilotée par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine. La tension d'accélération était de 80 kV.

3.1.2.2. Microscopie Electronique à Balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) a été développé par Max Knoll et Manfred von Ardenne dans les années 30 à la suite du microscope électronique à transmission. Il fut complété par Charles Oatley dans les années 60 afin de développer le premier appareil commercial. Le but de ces microscopes était d'étudier avec une "haute résolution" la surface d'un échantillon. Le principe est celui d'un faisceau d'électrons venant balayer la surface de l'échantillon qui, sous cet impact, réémet des particules qui sont captées par des détecteurs spécifiques. L'avantage du MEB par rapport au microscope optique est sa plus grande profondeur de champ et sa meilleure résolution. Cette dernière est de l'ordre du nanomètre, dans le meilleur des cas.

Une des parties les plus importantes du MEB est son canon à électrons (Figure 49A). Il en existe de différents types. Pour nos observations, nous avons utilisé un MEB équipé d'un canon à émission de champs (Field Emission Gun ou FEG en anglais) à cathode chaude. Le couple filament en tungstène/ZrO_2 émet des électrons sous les effets combinés d'une élévation de température due au passage d'un courant et d'une forte différence de potentiel entre la cathode (le filament) et l'anode

extractrice. Cette évolution technologique permet d'obtenir un faisceau beaucoup plus fin mais aussi beaucoup plus brillant que lorsque le filament est seulement chauffé (MEB dit "classique"). Le faisceau est ensuite accéléré dans la colonne électronique sous vide et focalisé par un jeu de lentilles magnétiques pour obtenir le spot le plus fin possible. Le balayage de la surface de l'échantillon est réalisé grâce à l'action de bobines déflectrices en X et en Y (Figure 49A). Le rapport entre le format de l'écran et celui de la zone balayée sur l'échantillon détermine le grossissement. Les MEB étant équipés de platines de déplacement, les échantillons sont disposés dessus. Ces platines sont soit manuelles, soit motorisées afin de permettre l'observation de différentes zones de l'échantillon.
Sous l'impact du faisceau, différents rayonnements sont réémis dont les électrons secondaires, les électrons rétrodiffusés et les rayons X. Ces 3 rayonnements sont captés par différents détecteurs ; ce sont les signaux les plus couramment utilisés (Paqueton and Ruste, 2006).

Les électrons secondaires sont captés par un détecteur de type Everhart-Thornley (Figure 49A) situé latéralement à l'objet et polarisé positivement pour attirer les électrons secondaires de faible énergie. Ces électrons donnent principalement une information sur la topographie de la surface et fournissent une cartographie où les nuances de gris peuvent correspondre à des différences de profondeur ou d'orientation par rapport au détecteur. Les électrons rétrodiffusés, quant à eux, fournissent des informations en contraste de phase selon la composition chimique de l'échantillon ou éventuellement en contraste cristallographique. Plus l'échantillon est riche en éléments lourds, plus le pourcentage d'électrons rétrodiffusés est élevé et donc plus l'image est localement brillante (Paqueton and Ruste, 2006). Ces électrons à énergie élevée sont réémis dans toutes les directions par rapport à l'échantillon. Le détecteur est situé au dessus de l'échantillon. Enfin, les rayons X sont interceptés par un spectromètre X en fonction de leur énergie (détecteur SDD – silicon drift detector) permettant d'obtenir un spectre de la composition chimique élémentaire de l'échantillon grâce au logiciel IDFix.

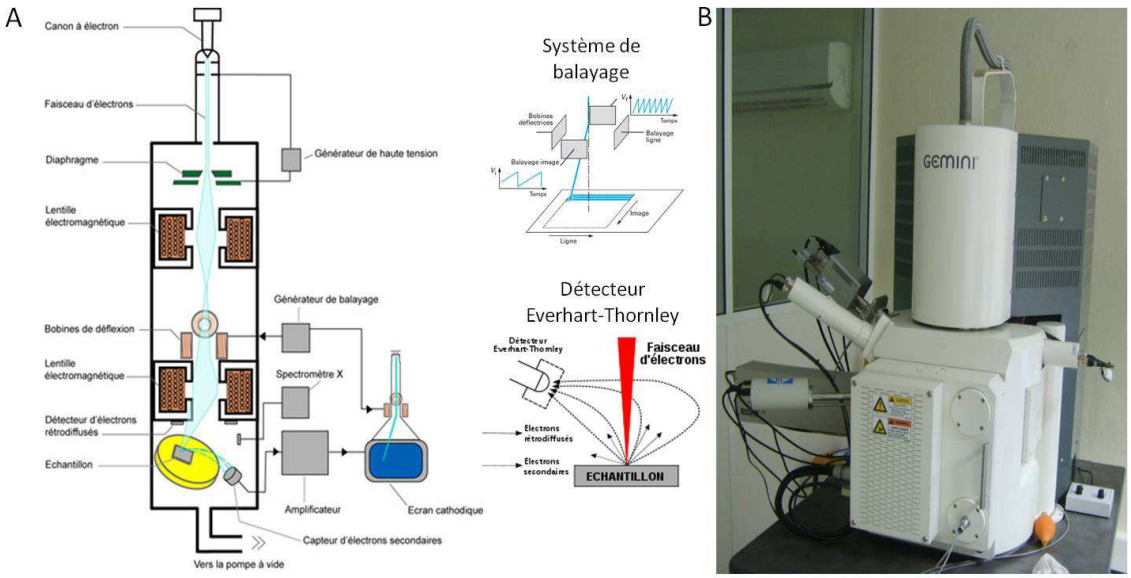


Figure 49 : Microscope électronique à balayage. A. Schéma d'un MEB et de ses composantes [Paqueton et Ruste, 2006]. B. Photo du MEB de l'ICMMO

Les observations ont été réalisées à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) avec François Brisset sur un FEG-MEB Zeiss Supra 55VP (Figure 49B) piloté par le logiciel

MaxView. Dans notre cas, les tensions appliquées ont été de 1 kV pour les échantillons non métallisés et de 15 kV pour les échantillons métallisés.

3.1.2.3. Micro-fluorescence X par rayonnement synchrotron

Le terme de synchrotron désigne un grand instrument électromagnétique destiné à l'accélération à haute énergie de particules élémentaires.
Le principe du rayonnement synchrotron est apparu dans les années 1940. Au départ, ce rayonnement était considéré comme un effet parasite des expériences de physique des collisions quand on a découvert qu'il pouvait être utilisé avantageusement pour d'autres expériences. D'effet indésirable exploité pendant les temps morts des instruments, il est devenu petit à petit le mode d'utilisation principal de ces machines, jusqu'à la construction d'installations dédiées au rayonnement synchrotron dans les années 1980.

Aujourd'hui, il existe une cinquantaine de synchrotrons dans le monde dont 2 en France : l'ESRF à Grenoble (European Synchrotron Radiation Facility ; 1994) et SOLEIL à Saint Aubin (Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE - Laboratoire d'utilisation du rayonnement électromagnétique ; 2006).

Le principe de fonctionnement de ces instruments est le suivant (Figure 50A) (Doucet and Baruchel, 2011) : des paquets d'électrons sont créés par un canon à électrons. Ils sont accélérés de façon linéaire dans le linac jusqu'à une vitesse proche de celle de la lumière. Puis, ils passent dans l'anneau d'accélération ou booster dans lequel leur énergie est augmentée jusqu'à plusieurs GeV (2,75 GeV à SOLEIL et 6 GeV à l'ESRF). Les électrons arrivent ensuite dans l'anneau de stockage (374 m à SOLEIL et 900 m à l'ESRF). Dans cet anneau, les paquets d'électrons tournent sans cesse. Leurs trajectoires sont guidées par des aimants de courbure (bending magnet ou BM). Ils réalisent des centaines de milliers de tours par seconde. Lors de ces trajectoires, à chaque courbure, un rayonnement de freinage est émis sous forme d'onde électromagnétique, c'est le rayonnement synchrotron (aussi appelé bremsstrahlung). Ce rayonnement polychromatique de photons est émis tangentiellement à la trajectoire et est envoyé vers les lignes de lumière. Pour obtenir un rayonnement plus intense dans les lignes de lumière, des éléments d'insertion (insertion device ou ID) se situent dans l'anneau et permettent une accélération plus forte des électrons. L'émission de ces rayonnements entraîne une légère perte d'énergie. Pour compenser ce phénomène, des cavités accélératrices sont activées plusieurs fois par jour (ESRF) ou en permanence (système top-up à SOLEIL) pour ré-accélérer les électrons dans l'anneau de stockage. Tout le système est placé sous un vide poussé (≈ 10^{-10} mbar) pour éviter que les paquets d'électrons n'entrent en collision avec des molécules de l'air. Au niveau de chaque BM ou ID, les photons émis tangentiellement sont utilisés pour mettre en œuvre différentes techniques dont les techniques dites spectroscopiques comme la fluorescence X (XRF) et la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) qui ont été utilisées pour ce travail. Il y a actuellement 43 lignes de lumière qui fonctionnent en parallèle à l'ESRF (Figure 50B) et 24 à SOLEIL.

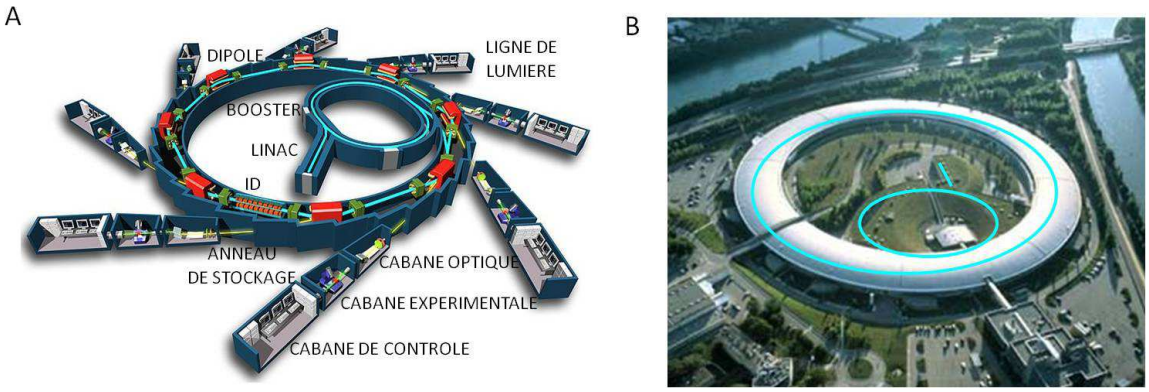


Figure 50 : A. Schéma de principe d'un synchrotron [adapté de fr.wikipedia.org] B. Vue aérienne de l'ESRF [maps.google.fr]

La ligne de lumière se décompose en trois cabanes. Dans la cabane optique se situe toute l'optique de la ligne permettant de sélectionner le rayonnement nécessaire à la technique développée (monochromateur) et de le focaliser (miroir). La cabane d'expérimentation est l'endroit où se trouve la chambre dans laquelle sont insérés les échantillons et les différents détecteurs. Et enfin, la cabane de contrôle permet de piloter toute la ligne à distance grâce à l'informatique puisque les deux premières cabanes sont inaccessibles lorsque le rayon passe.

Les avantages du rayonnement synchrotron sont, entre autres, un spectre d'émission très large allant de l'infrarouge aux rayons X et une brillance incomparable aux autres sources.
L'attribution du temps de faisceau se fait par un comité d'experts après étude d'un dossier d'expérience. Les expériences tournent 24h/24 et 7jours/7 sauf pendant les arrêts machine.

La **micro-fluorescence X** (µ-XRF pour X Ray Fluorescence) en balayage est une technique non destructive qui permet d'obtenir des cartographies élémentaires d'échantillons. Cette technique est basée sur la réémission de rayons X par les éléments constitutifs de l'échantillon sous l'excitation du faisceau de photons. Chaque élément renvoie des photons à l'énergie des rayons X avec une énergie caractéristique. Ces photons sont captés par un détecteur qui transforme ce signal en un spectre où chaque pic apparait à une énergie précise qui correspond à une transition entre les niveaux d'énergie d'un élément (Figure 51). Le rayonnement synchrotron permet d'augmenter le rapport signal/bruit par rapport à une source de rayons X de laboratoire, rendant la méthode extrêmement sensible et la résolution spatiale très bonne (Butler *et al.*, 2011). Ainsi, la limite de détection est de l'ordre de 0,1 µg/g et la résolution spatiale 3 x 3 µm² sur LUCIA (SOLEIL) et 0,2 x 0,8 µm² sur ID21 (ESRF).
Les spectres ainsi acquis sont analysés grâce au logiciel PyMCA (Sole *et al.*, 2007). La déconvolution des pics du spectre sur chaque pixel sondé permet de tracer des cartographies élémentaires. Une région d'intérêt est définie sur le spectre autour du pic de l'élément d'intérêt. Sur chaque pixel de l'image, le nombre de coups contenu dans la région d'intérêt est évalué, ce qui permet ensuite de retracer une image avec une intensité de couleur correspondante au nombre de coups.

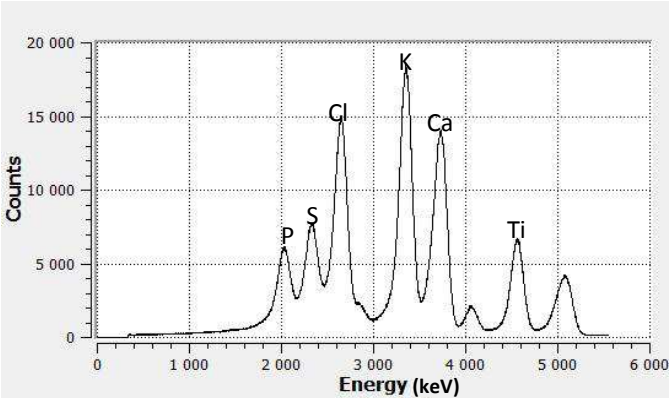


Figure 51 : Exemple de spectre de fluorescence d'un échantillon végétal

Les expériences sur synchrotron ont été réalisées en novembre 2009 et octobre 2010 sur LUCIA à SOLEIL avec Anne-Marie Flank et en février 2010 et juillet 2011 sur ID21 à l'ESRF avec Barbara Fayard et Giulia Veronesi.

3.1.2.4. Analyses par faisceau d'ions sur une microsonde nucléaire

La microanalyse nucléaire est une méthode d'analyse fondée sur les interactions d'un faisceau d'ions avec un échantillon. Elle permet le dosage de tous les éléments de la classification périodique par différentes techniques. Selon la nature du faisceau (type d'ions accélérés, énergie), plusieurs interactions sont possibles entre le rayonnement et la cible. Elles peuvent se classer en deux catégories : interactions électroniques et interactions nucléaires (Chu *et al.*, 1978). Il en résulte plusieurs techniques d'analyse permettant d'obtenir la répartition multi-élémentaire et quantitative d'un échantillon. Ces techniques possèdent 3 atouts majeurs : une profondeur de pénétration importante, une bonne sensibilité (≈ 10 µg/g) et surtout la possibilité d'avoir des résultats de concentration en éléments de manière quantitative. Nous nous contenterons de décrire les techniques utilisées dans cette étude : µ-PIXE, RBS et STIM.

Les études présentées ci-après ont été réalisées sur deux microsondes nucléaires :

- au Laboratoire d'Etude des Eléments Légers du CEA de Saclay en collaboration avec Hicham Khodja et Suzy Surblé.
- au Centre d'Etude Nucléaire de Bordeaux-Gradignan (CENBG) en collaboration avec Stéphanie Sorieul sur la microsonde AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine).

La majorité des analyses a été réalisée sur la microsonde du CEA de Saclay. C'est donc cette dernière qui sera décrite plus en détail dans la suite du paragraphe. L'obtention de temps de faisceau sur les deux installations est soumise à l'étude d'un appel à propositions portant sur l'intérêt du projet et sa faisabilité. L'attribution du temps se fait par shift de 24 h.

Obtention d'un faisceau d'ions

Une microsonde nucléaire (Figure 52A) s'appuie généralement sur un accélérateur électrostatique Van de Graff permettant la production d'un faisceau d'ions (Figure 52B). Ce faisceau

est accéléré par une différence de potentiel de plusieurs MeV (typiquement 3 MeV). Les ions sont transportés dans la ligne de faisceau qui est équipée de nombreux instruments : des déflecteurs pour guider la trajectoire des ions, des fentes-objet pour délimiter la taille du faisceau et contrôler sa position, d'une cage de Faraday pour mesurer l'intensité du faisceau d'ions, des lentilles quadripolaires magnétiques pour focaliser le faisceau en un spot de taille de l'ordre de quelques µm et enfin d'un système de plaques électrostatiques pour contrôler le balayage point par point de l'échantillon par le faisceau. La chambre d'analyses, mise sous vide (10^{-6} mbar) est munie de différents détecteurs permettant de réaliser les techniques d'analyses (Figure 52C).

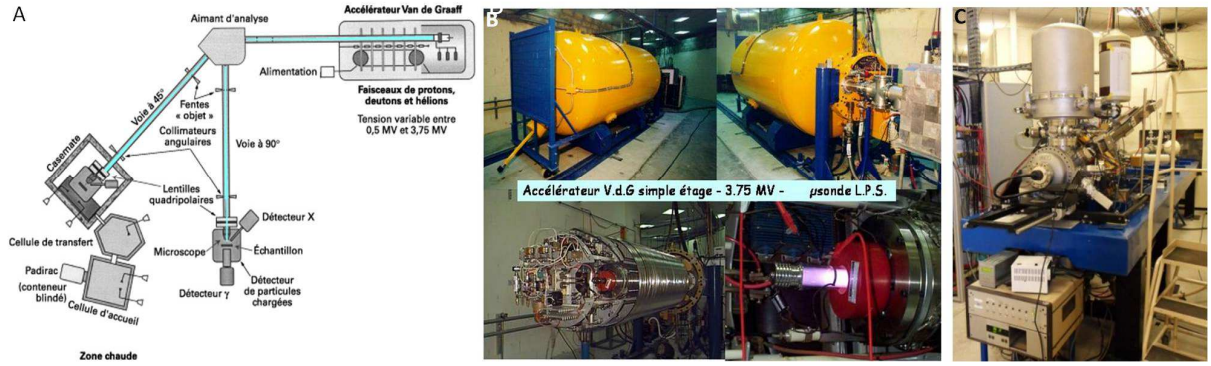


Figure 52 : A. Schéma de principe de la microsonde du SIS2M (CEA Saclay) [Berger et Revel, 2005]. B. Photos de l'accélérateur du SIS2M. C. Photo de la ligne et de la chambre de la microsonde du SIS2M.

Le faisceau entre en interaction avec la matière de l'échantillon et les réémissions sont enregistrées par des détecteurs. Comme le montre la Figure 53, on peut ainsi mener en parallèle plusieurs techniques d'analyse : ici, le µ-PIXE, le RBS et le STIM (Berger and Revel, 2005; Ortega, 2005). Dans notre cas, ces techniques seront mises en œuvre en mode balayage pour intégrer l'information obtenue sur une surface de 25 x 25 µm².

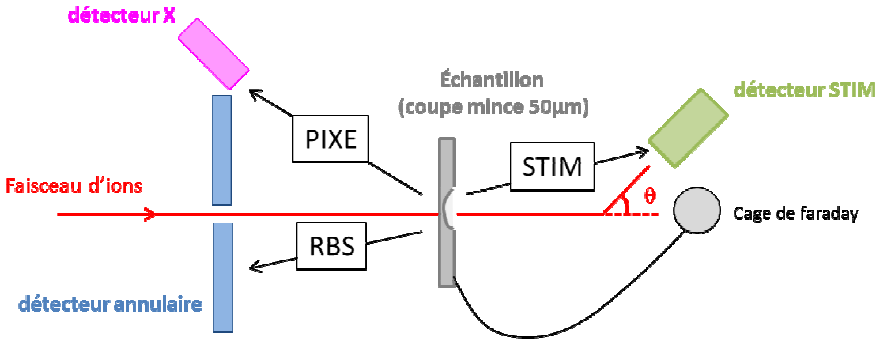


Figure 53 : Disposition des détecteurs par rapport à l'échantillon dans la microsonde du SIS2M.

Les différentes techniques d'analyses par faisceau d'ions mises en jeu

- **µ-PIXE (Micro Particles Induced X-ray Emission)**

L'émission de rayons X induite par des particules chargées apparait en 1970 avec Johansson. Cette technique met en jeu des interactions électroniques entre les particules incidentes et le cortège électronique des atomes cibles permettant l'excitation (ou l'ionisation) de ces atomes.

L'émission d'un photon X qui en résulte est caractéristique de l'élément analysé. Ce processus est identique à celui employé sur un MEB analytique. Néanmoins, comme le rayonnement de freinage du proton est très inférieur à celui des électrons, le fond continu en PIXE est inférieur au fond continu obtenu en MEB. Par conséquent, le seuil de détection en PIXE est plus bas. Cette méthode d'analyse est utilisée pour quantifier les éléments dont le numéro atomique Z est supérieur à 12 (magnésium). En effet, les photons X émis par les éléments légers (≤11, sodium) sont trop peu énergétiques pour être détectés (Moretto and Beck, 2003).

L'acquisition du signal se fait grâce à un détecteur de rayons X en dispersion d'énergie (silicon drift X ray detector XFLASH 4030 Bruker 30 mm²). Ce détecteur est généralement placé à 25 mm de l'échantillon pour optimiser la collecte des rayons X et à un angle de 45°. A chaque raie du spectre correspond un élément selon l'énergie détectée. Son intensité correspond à son abondance (Figure 54).



Figure 54 : Spectre PIXE obtenu à partir d'un faisceau de protons de 3 MeV (microsonde nucléaire de Saclay) sur une partie de racine de blé dans le logiciel RISMIN.

- **RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)**

La spectroscopie de rétrodiffusion Rutherford (RBS) a été mise au point par Ernest Rutherford dans les années 1910 et les premières applications sont apparues dans les années 1960 (avec notamment l'analyse d'un sol lunaire, mission Surveyor V à VI). La technique RBS fait intervenir des interactions nucléaires. Lorsque l'ion incident passe assez près d'un noyau de la cible, la répulsion coulombienne (interactions électrostatiques entre les charges positives des deux noyaux) devient sensible. La particule incidente entre en collision puis rebondit sur le noyau cible en perdant une partie de son énergie. Cette perte d'énergie est caractéristique de l'élément analysé (Berger and Revel, 2005). Le spectre est enregistré par un détecteur annulaire de particules à barrière de surface (Ortec 1500 µm) placé en face de l'échantillon.

Le spectre RBS obtenu pour un matériau présentant plusieurs éléments est composé de plusieurs paliers superposés. Il y a autant de marche que d'éléments détectés et chaque front de montée a une énergie caractéristique de l'élément. La hauteur de la marche est proportionnelle à la concentration de l'élément. Ce spectre est également informatif sur la distribution en profondeur. Ici, les échantillons étant relativement épais (50 µm), les particules subissent un freinage dans la

matière de l'échantillon avant d'être diffusées, ainsi les raies s'élargissent donnant un fond continu où l'on trouverait une succession de pics fins dans le cas d'un échantillon mince (Figure 55).



Figure 55 : Spectre RBS d'un échantillon végétal issu de RISMIN

- **STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy)**

La microscopie ionique en transmission informe de la densité de l'échantillon. Elle consiste à mesurer la perte d'énergie des particules incidentes à travers l'échantillon au moyen d'un détecteur de particules placé derrière l'échantillon (Berger and Revel, 2005). Le faisceau est d'abord intercepté par une feuille d'or qui diffuse une petite fraction du faisceau vers le détecteur à 45° (Ortec 500 µm). Le STIM s'apparente à la microscopie électronique en transmission utilisée en contraste d'absorption (Figure 56). En mode imagerie, elle permet également de déterminer la structure d'une coupe mince avec un contraste en densité.

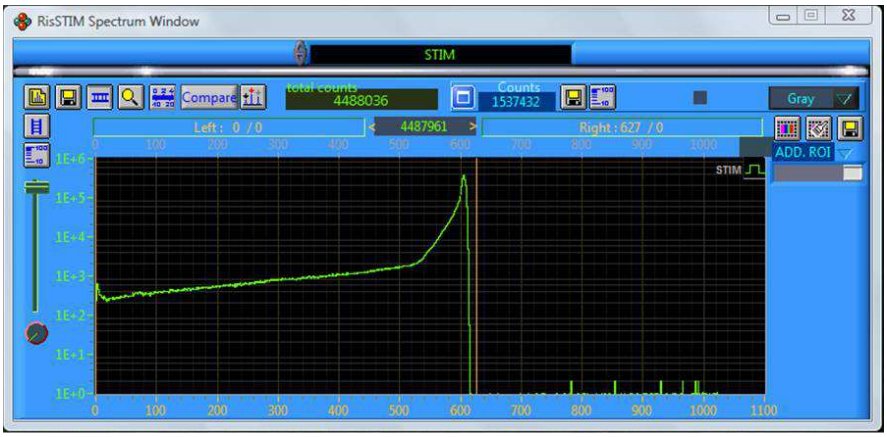


Figure 56 : Spectre STIM dans RISTIM.

Traitements des données

Nous avons choisi d'enregistrer pour les échantillons végétaux 6 jeux d'acquisition : 3 zones sur le cylindre central et 3 zones sur le parenchyme et ce pour des raisons statistiques. Chaque acquisition dure en moyenne 30 minutes. Plusieurs logiciels sont ensuite à notre disposition pour le traitement des données.

Le logiciel RISMIN (Daudin *et al.*, 2003) permet de relire les données d'acquisition et de les transformer en fichier de données utilisables par d'autres utilitaires. RISMIN possède de nombreuses

possibilités d'exploitation notamment des cartographies. La Figure 57 représente les cartographies obtenues pour chaque élément à partir d'un spectre PIXE. C'est également grâce à ce logiciel que l'on peut délimiter les zones à étudier et séparer, par exemple l'épiderme du parenchyme et du cylindre central.

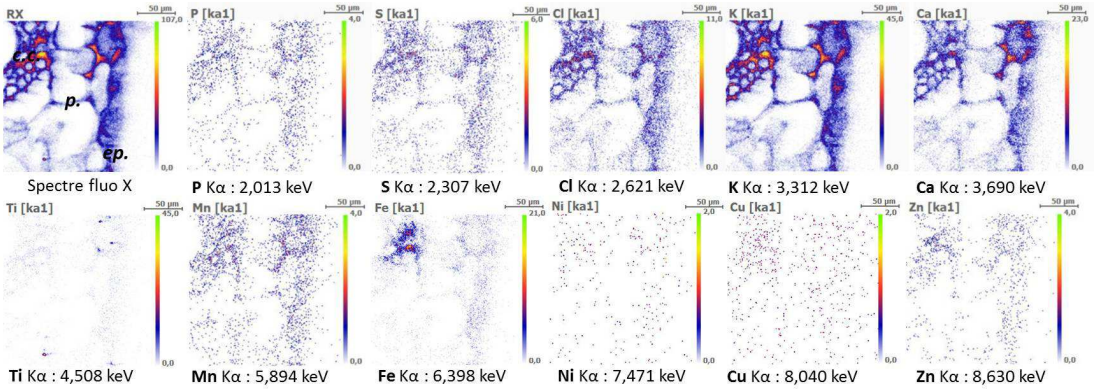


Figure 57 : Répartition associée de chaque élément dans la racine de blé (*c.c. cylindre central, p. parenchyme, ep. épiderme*)

RISTIM, programme basé sur RISMIN, permet le traitement des spectres STIM pour obtenir des images en contraste de densité (Figure 58).

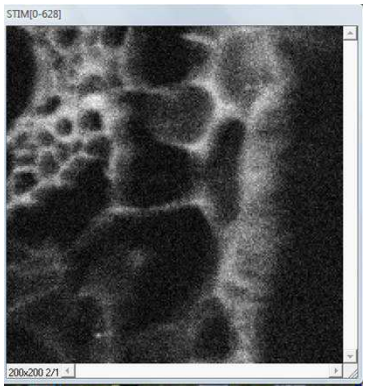


Figure 58 : Cartographie obtenue à partir d'un spectre STIM sur une partie de racine de blé

SIMNRA (Mayer, 1997) permet, à partir du spectre RBS, de déterminer la composition et l'épaisseur de l'échantillon et donc d'estimer la perte d'énergie dans les échantillons, données essentielles pour le traitement des données des spectres X. L'utilisation de SIMNRA requiert la connaissance de la géométrie de l'installation utilisée et les quantités approximatives de chaque élément.

Un dernier logiciel, GUPIX (Campbell *et al.*, 2000), permet de traiter les données X pour obtenir des concentrations en ppm des éléments de l'échantillon.

Le croisement de toutes ces techniques (µ-PIXE, RBS et STIM) permet d'obtenir des informations quantitatives sur la composition de l'échantillon avec une précision de l'ordre de 5% et une sensibilité de quelques ppm, ainsi qu'une information sur la répartition spatiale de chaque élément. La quantification doit tenir compte, entre autres, du ralentissement des protons incidents dans

l'épaisseur de la cible ainsi que des conditions expérimentales : charge intégrée par l'échantillon, énergie des particules incidentes, efficacité du détecteur, épaisseur et composition de la matrice.

Avant de commencer l'exploitation des données expérimentales obtenues sur nos coupes, il est nécessaire de calibrer les détecteurs utilisés en utilisant le verre NIST 620 (National Institute of Standards and Technology, USA), dont la composition est connue. On en déduit ainsi les angles solides du détecteur annulaire et du détecteur X.

Dans un premier temps, on entre dans SIMNRA les données caractéristiques de l'installation (nature et énergie du faisceau / géométrie de l'installation – fenêtre 1) puis la composition de notre échantillon (fenêtre 2) (Figure 59). L'analyse des spectres RBS est faite de façon itérative en fixant *a priori* l'épaisseur de l'échantillon, la composition initiale de la matrice ($H_{6000}C_{4000}O_{3000}N_{100}K_{24}Ca_{12}$; (Collins *et al.*, 2010) et la charge intégrée (fenêtre 3). Puis, il est possible de réajuster légèrement la composition et l'épaisseur de la matrice. On peut ainsi estimer la perte d'énergie (energy loss dans la fenêtre 4) des protons incidents quand ils traversent cet échantillon en fonction de l'épaisseur et de la composition de la matrice.

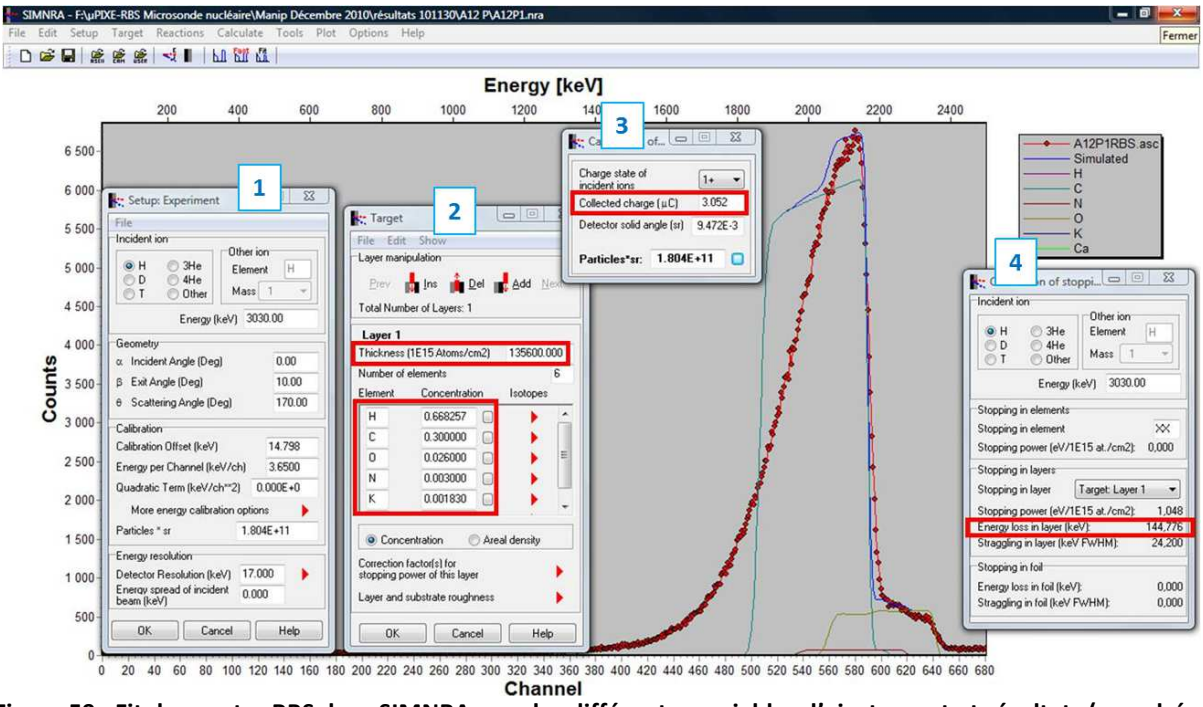
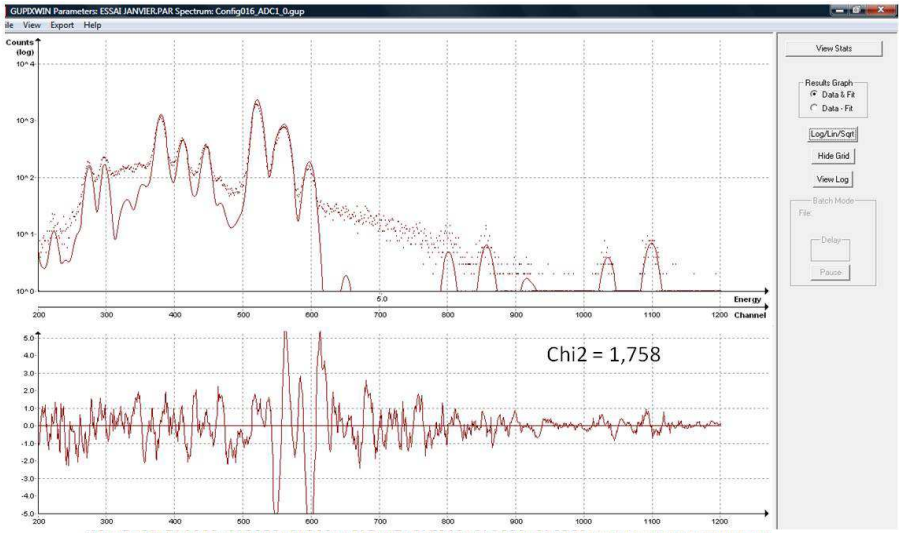


Figure 59 : Fit du spectre RBS dans SIMNRA avec les différentes variables d'ajustement et résultats (encadrés rouges)

Les données de composition, d'épaisseur et de perte d'énergie, issues de SIMNRA, sont ensuite réutilisées pour exploiter le programme GUPIX. Ce logiciel permet, dans un premier temps, de simuler le bruit de fond des spectres PIXE ainsi que les artefacts liés à l'acquisition du signal (pics d'échappement et d'empilement) (Figure 60A). Le spectre corrigé apparait dans la fenêtre supérieure, dans la fenêtre inférieure apparait la différence entre ces deux spectres. De ce spectre corrigé, le logiciel calcule la composition quantitative (en ppm) de la zone analysée dans la racine de blé (Figure 60B).

A



B

```
################################################################################
File:B140par.asc                Sec:   600.   uC:  1.670  nA:  2.783  PUcor:1.0066
The last column is a decision on the presence of that element in the spectrum.
(A "*" indicates the minimum background was used in the LOD calc).
  Y: present at level of quantization,   N: not present at limit of detection
  ?: may be present near LOD levels (user must decide)  H or uC Corr[F]: 1.000
Note: Surface element (Layer=-1) concs in ng/cm2          Det Res(eV): 164.1
      Layer      H    Yield Det. Filter          Chi**2:    0.814 (    0.814)
Element    Area  value  /uC/ Eff. Trans.      Conc.  %Stat.  %Fit      LOD
 Z Sym  #  counts ( -4)   ppm (-3)  (-5)       ppm    Error  Error     ppm
 -- ---  -  ------ -----  ------ ---- ------  ------  ------ ------  ------
14 SiK  1    19.6   570   1462  823      0  81947.3  107.87 116.86 160016.5 ?
15 P K  1    59.9   570   1192  866     18   3457.6   38.28  46.06   2587.2 ?
16 S K  1   340.2   570   1020  905    308   1263.8    9.87  12.63    218.1 Y
17 ClK  1  2242.1   570  804.7  931   1881   1682.7    2.86   4.59     75.3 Y
19 K K  1 31093.7   570  540.0  961  13758   4603.5    0.52   3.45     19.5 Y
20 CaK  1  5945.9   570  448.7  970  23811    606.5    2.58   3.94     27.7 Y
22 TiK  1   788.9   570  271.2  982  45672     68.6    7.02   7.28      8.1 Y
25 MnK  1   428.8   570  138.0  991  70717     46.9    6.63   7.45      4.5 Y
26 FeK  1  1341.0   570  112.3  993  76381    166.5    2.59   4.85      3.1 Y
29 CuK  1   124.3   570  54.66  995  87456     27.6    9.50  10.72      2.4 Y
30 ZnK  1   254.8   570  43.32  990  89769     70.0    6.05   7.74      3.5 Y
################################################################################
```

Figure 60 : Quantification élémentaire de l'échantillon à partir des données expérimentales obtenues sur une microsonde nucléaire. A. Spectre PIXE et fit dans GUPIX. En haut : en trait pointillé spectre expérimental, en trait plein spectre ajusté. En bas : différence entre spectre expérimental et spectre ajusté. B. Table de concentrations après analyse du spectre X dans GUPIX.

3.1.3. Préparation des échantillons

Lors de la préparation des échantillons biologiques, les différents organes des plantes sont soigneusement rincés à l'eau distillée pour éliminer tous les nanomatériaux faiblement adhérents à la surface. Puis lors des coupes, les témoins et les organes non-exposés sont coupés en premier puis les organes exposés. La lame est rincée entre chaque série de coupes pour éviter de contaminer les coupes suivantes avec des nanomatériaux qui pourraient provenir de la surface de l'échantillon.

3.1.3.1. Préparation pour la microscopie électronique à transmission

Le vide poussé régnant dans la colonne du MET ainsi que la nécessité d'échantillons très minces impliquent une préparation préalable en plusieurs étapes des échantillons biologiques (Schrand *et al.*, 2010; Garaud and Roussel, 2011). En ce qui concerne l'observation des nanomatériaux, aucune préparation n'est nécessaire. Une goutte de suspension est déposée sur la grille (Formvar carbone mesh 400) et après 5 min de séchage, le surplus est absorbé à l'aide d'un papier filtre.

Fixation / Post-fixation

Cette étape a pour but de figer la structure des tissus végétaux en créant des ponts inter- et intra-moléculaires grâce à des agents de pontage chimique. Ils réagissent principalement avec les groupements aminés des protéines (Figure 61). Pour une meilleure fixation, les échantillons doivent être de petite taille. Ainsi des tronçons de racines, de tiges et de feuilles d'1 mm², préalablement rincés à l'eau distillée, sont prédécoupés pour la fixation. Deux fixateurs ont été employés en mélange : le formaldéhyde (1%) et le glutaraldéhyde (3%). Les bains de fixateurs sont réalisés à froid (4°C) dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M, pH 7,4).

La post-fixation est effectuée avec du tétroxyde d'osmium (OsO_4) à 2% qui est indispensable pour une bonne préservation des membranes. Il réagit principalement avec les doubles liaisons insaturées des lipides (Figure 61) mais également avec les groupements -SH, -C=C-, -H_2, -SS, -CHO et -OH.

Cette association de fixateurs est le protocole de fixation standard pour les études ultrastructurales et permet de préserver la structure des tissus (Garaud and Roussel, 2011).

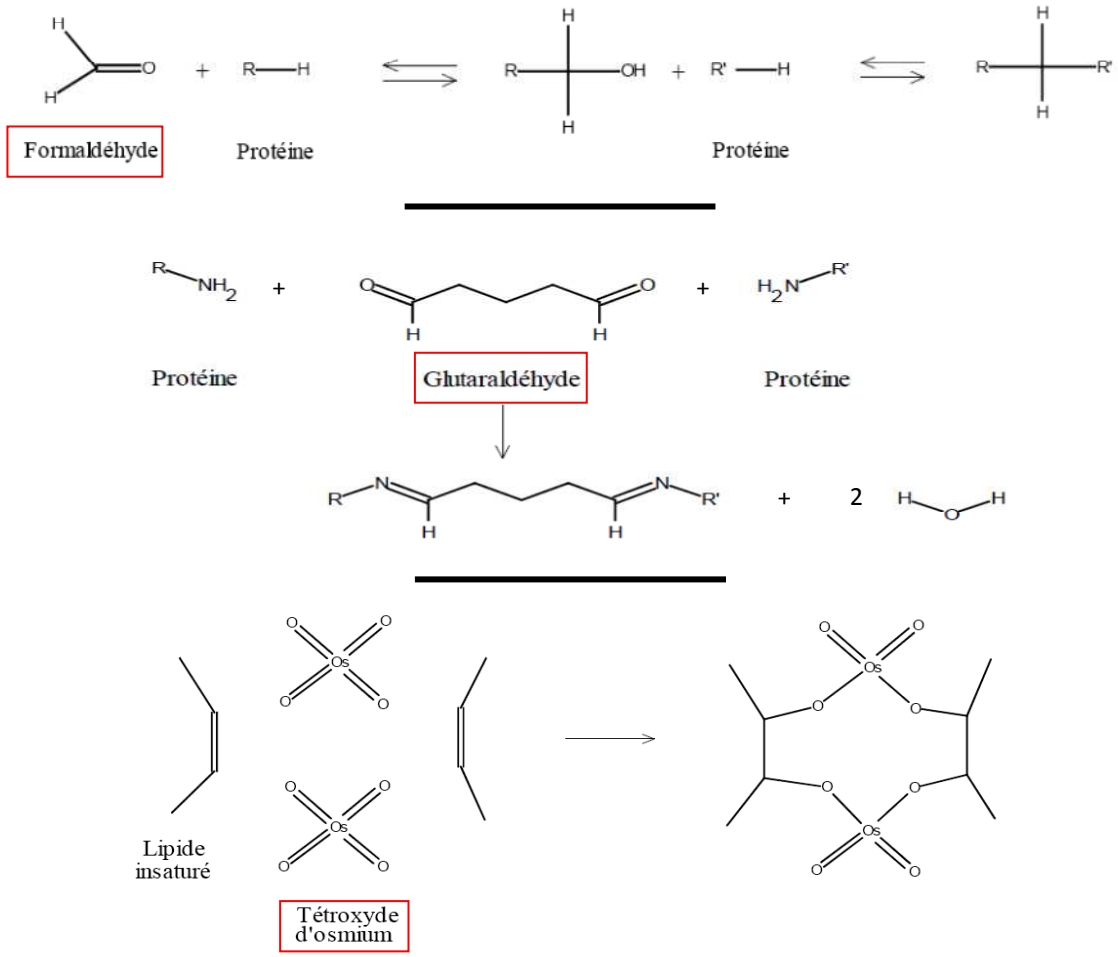


Figure 61 : Fixation par pontage chimique des molécules par le formaldéhyde, le glutaradéhyde et le tétroxyde d'osmium [Garaud et Roussel, 2007]

Déshydratation / Substitution

Une étape de déshydratation est nécessaire pour permettre la pénétration de la résine d'inclusion qui est hydrophobe. Les échantillons sont donc plongés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 30 à 100%) jusqu'à élimination complète de l'eau.

Imprégnation / Inclusion

Dans cette étape, la résine d'inclusion liquide pénètre dans les tissus végétaux. La résine utilisée est une résine époxy Spurr (10 g ERL4421, 6 g DER736, 26 g NSA). La résine Spurr est progressivement substituée à l'éthanol 100%. Puis, les échantillons sont coulés dans des blocs avec de la résine Spurr contenant en plus un agent durcisseur (0,4 g DMAE) (Figure 62A). Après polymérisation à chaud (70°C), cette résine durcit et permet de réaliser les coupes ultrafines d'échantillon nécessaires aux observations en MET.

Ultramicrotomie

Une zone d'intérêt est repérée au microscope sur le bloc. Le bloc est ensuite taillé pour délimiter une petite zone pyramidale autour de la zone d'intérêt pour limiter les contraintes de cisaillement lors de la coupe ultrafine à l'ultramicrotome.

Une première série de coupes semi-fines de 200 nm est préparée avec un couteau de verre et colorée au bleu Azur II pour vérifier la pertinence de la zone au microscope optique. Puis, au couteau diamant, des coupes de 70 nm sont réalisées et déposées sur des grilles de nickel avec membrane de formvar carbonée. En effet, le matériel utilisé étant relativement fragile, cette membrane limite les dégâts liés au faisceau d'électrons.

Les coupes sont réalisées sur un ultramicrotome Reichert-Jung (Figure 62B).

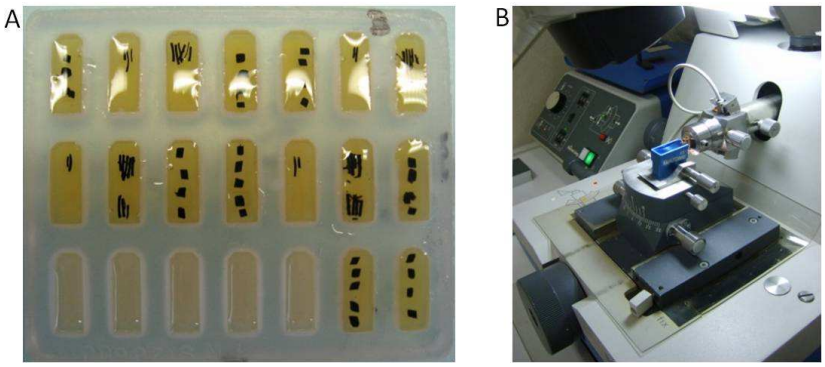


Figure 62 : Préparation pour microscopie électronique à transmission. A. Blocs d'inclusion contenant des fragments de racine et de tige. B. Ultramicrotome du CCME d'Orsay

Coloration

Finalement, pour les échantillons exposés aux TiO_2, les coupes sont colorées à l'acétate d'uranyle.

3.1.3.2. Préparation pour toutes les autres techniques

Cette préparation est commune à toutes les techniques d'imagerie suivantes : MEB, rayonnement synchrotron et faisceau d'ions. Seul le porte-échantillon change selon la technique.

Inclusion

Dans un premier temps, les échantillons sont cryofixés dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide à -165°C pour préserver les structures végétales. Les fragments de racines, tiges et feuilles

sont ensuite inclus dans une résine Tissue-Teck® OCT (Sakura Fineteck) (Figure 63). Les blocs sont immédiatement congelés pour obtenir le durcissement de la résine.



Figure 63 : Dispositif de cryofixation / inclusion des échantillons végétaux pour l'imagerie

Coupe

Les blocs de résine congelés sont coupés sur un cryomicrotome (Figure 64A-B) à Orsay dans l'équipe Développement, Morphogénèse et Evolution (UMR 8080) avec l'aimable autorisation de Chantal Ballagny. La température de la chambre et du porte-objet est de -20°C. Les coupes ont une épaisseur de 50 µm (Figure 64C) et sont déposées sur le porte échantillon adapté à la technique d'imagerie employée ultérieurement.

Puis, les échantillons sont lyophilisés pour éliminer toute trace d'eau, ce qui est indispensable pour toutes les techniques d'imagerie où les chambres d'échantillons sont placées sous vide.

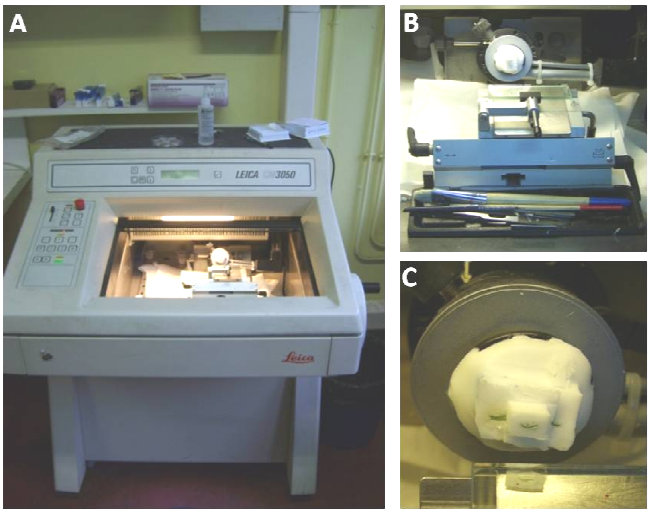


Figure 64 : A. Cryomicrotome, B. zoom sur le poste de coupe, C. zoom sur l'échantillon et la coupe de 50 µm

Métallisation

Pour les observations en MEB, les échantillons doivent être conducteurs pour éviter les accumulations locales d'électrons aux points d'observation (effets dits de "charges"). Les échantillons sont donc métallisés (Figure 65A) c'est-à-dire recouverts d'un fin dépôt de carbone (Figure 65B). Néanmoins, cette étape peut cacher certains détails fins des structures. Par exemple, l'addition d'une couche métallique lors de l'observation des nanomatériaux, en vue de la détermination de leur diamètre nominal, aurait pour conséquence d'augmenter de façon fausse le diamètre apparent.

Cette étape a donc été supprimée. Les observations ont alors été réalisées à plus faible tension d'accélération (1 kV).

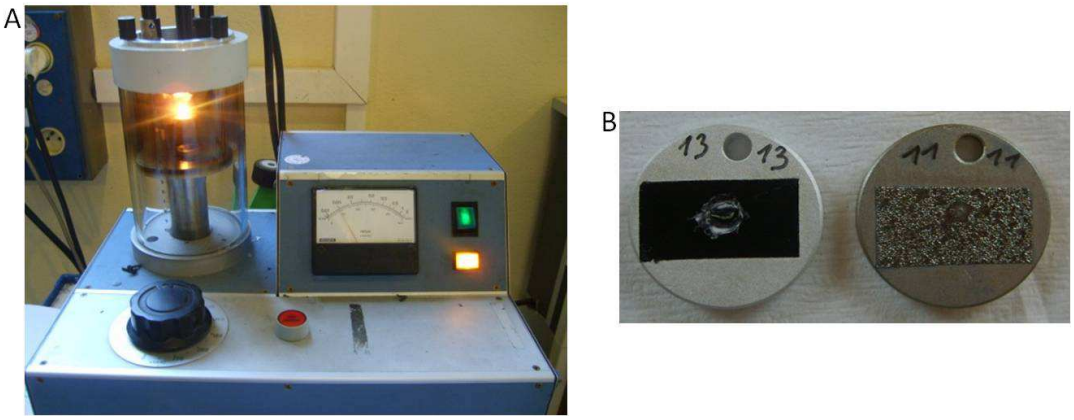


Figure 65 : Métallisation. A. Flash de métallisation dans le métalliseur. B. Aspect des porte-échantillons avant (à gauche) et après (à droite) la métallisation.

3.2. Autoradiographie

Les NTC étant composés essentiellement de carbone, de même que le tissu végétal, ils ne sont pas détectables par les techniques basées sur le rayonnement synchrotron ou sur les faisceaux d'ions. Pour la répartition au sein des tissus végétaux, des $MW^{14}CNTs$ ont été utilisés. Pour ces expériences, les végétaux sont donc exposés en hydroponie aux $MW^{14}CNTs$.

3.2.1. Principe

L'autoradiographie est une méthode d'enregistrement du lieu d'émission de radiations ionisantes émises par une source radioactive incorporée dans un tissu. Elle a été mise au point par Georges Charpak, ce qui lui valu un prix Nobel en 1992. Cette technique permet de localiser et de quantifier des composés radioactifs (Bourrel and Courrière, 2003).

L'échantillon radiomarqué est introduit dans la chambre du détecteur à avalanches à faces parallèles (Figure 66A). Cette chambre est sous atmosphère gazeuse (98% argon, 2% triéthylamine). Chaque particule β émise par l'échantillon vient ioniser une molécule de gaz ; cette ionisation libère des électrons qui sont accélérés par une différence de potentiel entre les deux faces parallèles de la chambre. Les collisions successives des électrons avec le gaz créent une avalanche d'électrons et au final des photons. Cette lumière est enregistrée par une caméra. Le signal obtenu est ensuite traduit en une position du point émetteur initial grâce à des algorithmes de reconstruction. L'enregistrement de toutes ces positions permet de recréer une image de la répartition quantitative de la radioactivité de l'échantillon (Bq/cm^2).

Cette technique appliquée sur un β imager (Figure 66B) atteint une résolution de 60 x 60 µm² avec une très bonne sensibilité. Sur un µ-imager (Figure 66C), la résolution descend jusqu'à 15 x 15 µm².

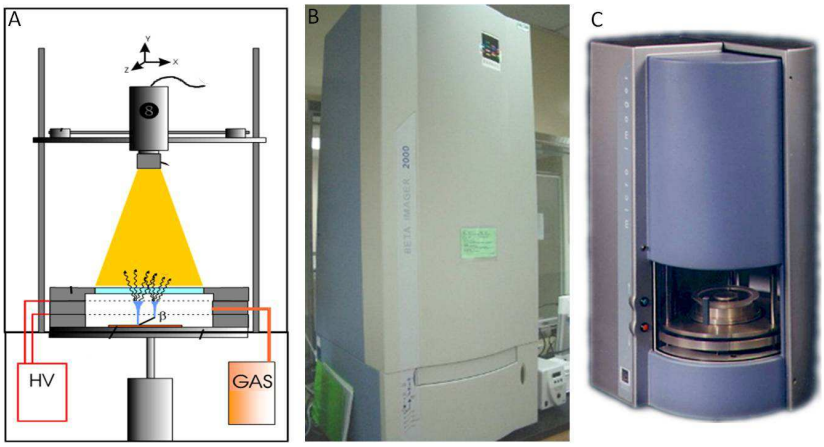


Figure 66 : A. Schéma de principe d'un β-imager [www.biospacelab.com], B. photo d'un β-imager, C. photo d'un µ-imager

3.2.2. Préparation des échantillons

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'IBITEC (Institut de Biologie et de Technologie) au CEA de Saclay. Les expositions ont été réalisées dans le laboratoire de marquage au carbone 14 avec l'aide de Dominique Georgin et Frédéric Taran. Les parties aériennes des plantes exposées ont été séchées à plat dans une étuve à 40°C avant d'être analysées sur les radio-imagers du Laboratoire de Chimie pour le Vivant avec l'aide de Bertrand Czarny.

3.3. Quantification par spectroscopie de masse couplée à un plasma inductif

3.3.1. Principe

La spectroscopie de masse couplée à un plasma inductif (ou ICP-MS pour Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer) est une technique d'analyse chimique développée dans les années 80 par Date et Gray. Elle permet des dosages rapides de la quasi-totalité des éléments du tableau périodique (du lithium à l'uranium) en fonction de leur masse. La sensibilité est excellente, de l'ordre du µg/L et la précision est de l'ordre de quelques %. Cet instrument est aujourd'hui utilisé en routine pour des mesures d'éléments-trace voire ultra-trace. Cette méthode repose sur le couplage entre une torche à plasma qui nébulise et ionise les éléments de l'échantillon et un spectromètre de masse qui sépare, identifie et quantifie les éléments (Paucot and Potin-Gautier, 2010).

Cette technique d'analyse se décompose en 4 grandes étapes : la nébulisation de l'échantillon liquide, l'ionisation, la séparation en masse et la détection (Figure 67A).

L'échantillon liquide est pompé vers le nébuliseur grâce à une pompe péristaltique. Dans le nébuliseur, l'échantillon est vaporisé sous forme de fines gouttelettes par un flux d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est ensuite emmené par le flux d'argon vers la chambre de nébulisation qui

élimine les gouttelettes trop grosses. Les fines gouttelettes restantes sont transportées dans la torche à plasma. C'est ici que l'échantillon est vaporisé puis ionisé sous l'influence d'un plasma d'argon créé par l'action d'un fort champ magnétique. L'échantillon est alors uniquement constitué d'ions de charge positive unique. L'ionisation se fait à très haute température (jusqu'à 10 000°C) et à pression atmosphérique. L'analyse dans le spectromètre de masse se fait, quant à elle, à très basse pression (≈ 10^{-8} bar). Il existe donc, entre ces deux compartiments, un système de cônes permettant de passer des conditions de fonctionnement de la torche à plasma à celles du spectromètre sans modifier les propriétés de l'échantillon. L'échantillon passe d'abord un premier cône en nickel appelé sampler (échantillonneur) puis un second : le skimmer (écumoire). Ces cônes ont des orifices de sortie d'environ 1 mm. Entre les deux cônes, une première pompe abaisse la pression, puis après le second, la pression est encore diminuée pour atteindre celle du spectromètre. A la sortie des cônes, l'échantillon est polarisé par des lentilles ioniques pour pénétrer dans le quadripôle du spectromètre. Ce quadripôle joue le rôle de filtre passe-haut et passe-bas. En effet, les éléments sont sélectionnés dans un champ électromagnétique selon leur masse et seuls les ions possédant un certain rapport masse sur charge (m/z) ont accès au détecteur ; les autres sont déviés et perdus. Le détecteur est un multiplicateur d'électrons : un ion venant taper sur la paroi du détecteur génère un électron qui donne par cascade en sortie des centaines d'électrons. Ce signal est ensuite transmis à un système d'acquisition sur ordinateur qui le converti en nombre de coups.

3.3.2. Mesures

Comme toute technique analytique, la mesure par ICP-MS nécessite des étalonnages.
Dans un premier temps, le nombre de coups est converti en concentration, grâce à la mesure d'une gamme d'étalonnage contenant le ou les éléments à doser.

D'autre part, un étalon interne est ajouté à chaque échantillon pour mettre en évidence une éventuelle dérive du signal et donc ajuster les résultats des échantillons dosés. Cet étalon interne est composé de standards monoélementaires (ici germanium). Il est choisi à la fois parce qu'il est absent de l'échantillon et parce qu'il est dans la même gamme de masse que l'élément d'intérêt.

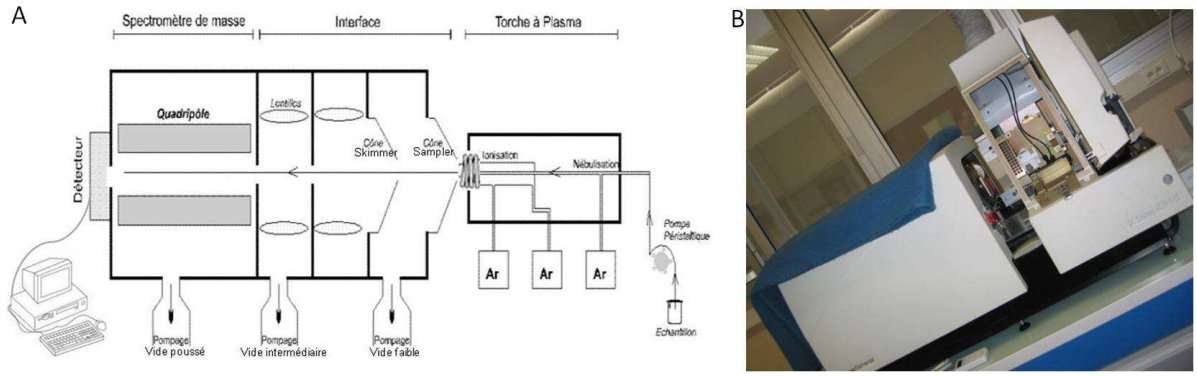


Figure 67 : A. Schéma de principe d'une ICP-MS. B. Photo de l'ICP-MS du SIS2M

Enfin, de façon à vérifier la justesse des mesures et le rendement de mise en solution des échantillons, un standard de composition certifiée est également dosé en fin d'expérience (dans notre cas lake sediment, IAEA-SL-1). D'autre part, des blancs de chimie de mise en solution contenant

uniquement les réactifs utilisés pour la préparation des échantillons et ayant subi le même traitement sont dosés simultanément aux échantillons. Ces blancs permettent de vérifier qu'il n'y a pas eu de pollution au cours de la préparation des échantillons et d'obtenir le bruit de fond (Butler *et al.*, 2011).

Dans notre étude, les analyses ont été réalisées sur l'ICP-MS Series X7 (Thermo Electron Corporation) du SIS2M équipée de cônes HPi et pilotée par le logiciel Plasmalab (Figure 67B).

3.3.3. Préparation des échantillons

L'analyse ICP-MS s'effectuant sur des échantillons liquides, il faut au préalable mettre en solution les échantillons solides (Hoenig, 2001). Cela se fait par une succession d'attaques acides pour briser la structure solide (Mariet *et al.*, 2008).

Dans le cas particulier des NPs (Scheffer *et al.*, 2008), une attaque acide relativement forte a été mise en place. Ainsi, la minéralisation a été réalisée avec des réactifs ultrapurs selon le protocole suivant : 50 mg d'échantillon solide sec ont été introduits dans une bombe en Téflon et additionnés de 2 mL d'acide nitrique (HNO_3 67%), 1 mL d'acide perchlorique ($HClO_4$ 70%) et 1 mL de fluorure d'ammonium (NH_4F 45%). Les bombes sont refermées hermétiquement et placées à chauffer pendant 2h sur un bain de sable (210°C). 1 mL d'eau oxygénée (H_2O_2 35%) est ajouté et les bombes sont replacées pour 1h sur le bain de sable. Les échantillons subissent ensuite un cycle de trois évaporations avec ajout de 1 mL d'acide nitrique après chaque évaporation. L'évaporation se fait jusqu'à l'obtention d'une unique goutte au fond de la bombe. Enfin, 1 mL d'eau ultrapure est ajouté à la dernière goutte et la bombe est replacée sur le bain de sable pour 30 min, couvercle fermé. Le résidu en fin de minéralisation est transféré dans des tubes avec 50 mL d'eau acidifiée (2% HNO_3 en vol.). Selon la concentration attendue en titane dans les échantillons, ceux-ci sont redilués avec de l'eau acidifiée pour atteindre des valeurs entrant dans la gamme étalon (0 à 50 ppb).

4. Impact des nanomatériaux sur le développement et la physiologie des végétaux

4.1. Impact sur le développement

Plusieurs paramètres de développement ont été étudiés : le taux de germination et la longueur racinaire dans un premier temps, puis la biomasse sèche ainsi que l'évapotranspiration (ETP) dans un second temps. Ces paramètres permettent d'évaluer si le développement de la jeune plantule est perturbé par la présence de nanomatériaux dans le milieu.

Les deux premiers tests ont été réalisés selon les lignes de conduite de l'US-EPA (US-EPA, 1996). 10 graines par espèce sont mises à germer en hydroponie dans une boite de Pétri avec 7 mL de milieu. 3 boites de Pétri par condition sont mises en place. Les concentrations d'exposition sont 0, 10, 50 et 100 mg/L de nanomatériaux. Les graines de colza ont été exposées à des nanomatériaux dispersés dans de l'eau ultrapure ou dans du Hoagland. En revanche, les plantules de blé ont été exposées uniquement à des particules préparées dans de l'eau ultrapure. Les graines de blé dans le Hoagland étaient rapidement contaminées ce qui perturbait la germination. Après 7 jours, le nombre

de graines germées est comptabilisé (Figure 68A). Une graine est considérée comme germée lorsque sa radicule atteint 5 mm de longueur. Ces graines germées sont ensuite disposées sur un papier noir muni d'une échelle et photographiées. Les photos sont transférées vers le logiciel Image J où les racines peuvent être mesurées précisément.

Cinq plantules par condition sont prélevées et transférées dans des tubes de 15 mL remplis de Hoagland pour poursuivre leur croissance pour 7 jours supplémentaires (Figure 68B). A la fin de l'expérience, les plantules sont séchées pendant 48 h à 60°C permettant la mesure, par pesée, de la biomasse sèche. L'ETP est également évaluée par différence de niveau du milieu nutritif restant dans le tube en fin d'expérience.

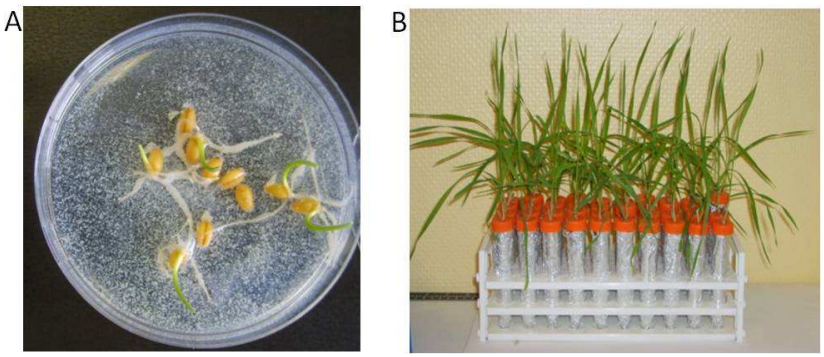


Figure 68 : A. Evaluation de la germination et de la longueur racinaire du blé en boite de Pétri. B. Evaluation de la biomasse et de l'évapotranspiration du blé en tubes

4.2. Impact sur la photosynthèse: teneur en pigments chlorophylliens

Les teneurs en chlorophylle A, en chlorophylle B et en caroténoides ont été évaluées dans les feuilles des plantules exposées. Ces mesures permettent d'évaluer le niveau d'altération de la photosynthèse due à l'exposition aux nanomatériaux.

Les plantules mises à germer sur du sable humide pendant 15 jours sont exposées en hydroponie pendant 7 jours à 50 mg/L de NTC ou à 100 mg/L de TiO_2. A la fin de cette période, les feuilles sont prélevées. 100 mg de feuilles fraiches sont broyés à l'azote liquide dans un mortier en agate. L'extraction des pigments est réalisée par l'addition de 30 mL d'acétone (80% en vol.). Une pointe de spatule de carbonate de sodium (Na_2CO_3) est ajoutée pour neutraliser l'acidité de la solution ainsi obtenue. Le tout est ensuite transvasé dans un tube de 50 mL, protégé de la lumière et conservé à 4°C pendant une nuit. Juste avant les mesures, cet extrait est centrifugé (5 min, 5000 g).

Les mesures d'absorbance sont réalisées par spectrophotométrie sur 200 µL de solution dans des plaques 96 puits en polystyrène cristal (résistantes à l'acétone) sur un lecteur de plaques (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA) à différentes longueurs d'onde : 470, 645, 652 et 663 nm.
Les teneurs en pigments sont déduites des absorbances d'après les formules de Moran (Moran, 1982) (V, volume en mL et FW, poids frais en g) :

*Chlorophylle a = (12,21*DO_{663} - 2,81*DO_{645})*V / (1000*FW)*
*Chlorophylle b = (20,13*DO_{645} - 5,03*DO_{663})*V / (1000*FW)*
*Caroténoide = [(1000*DO_{470} - 3,27*chloro a - 104*chloro b)/229]*V / (1000*FW)*
Chlorophylle totale = chlorophylle a + chlorophylle b + caroténoide

4.3. Evaluation du stress oxydant : dosage du peroxyde de dihydrogène et de la peroxydation lipidique

Le peroxyde de dihydrogène (H_2O_2) est une espèce réactive de l'oxygène (ROS). Tous les organismes produisent en permanence des ROS. Les cellules disposent d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase. Le stress oxydant apparaît dès que l'équilibre entre la production de ROS et leur élimination par le système de protection est rompu. Cette situation peut être due à une surproduction de ROS et/ou à l'inactivation du système enzymatique, et a de nombreuses conséquences sur les cellules, dont la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique est une dégradation des lipides qui constituent la membrane de la cellule. Cette dégradation conduit notamment à la formation du malondialdéhyde (MDA) (Figure 69A). Le MDA fait partie des espèces qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) regroupées sous l'appellation TBARS (pour ThioBarbituric Acid Reactive Species) (Figure 69B). Cette réaction conduit à la formation d'un produit coloré dosable en spectrophotométrie.

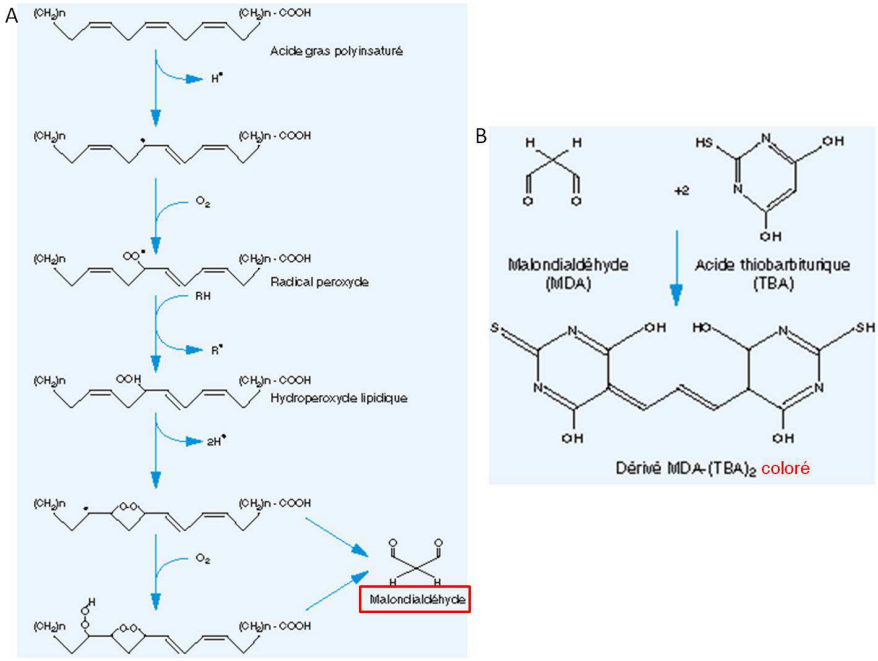


Figure 69 : Peroxydation lipidique. A : Voie de synthèse du malondialdéhyde à partir des acides gras polyinsaturés des membranes plasmiques. B. Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique [www.jle.com]

Le dosage en parallèle du H_2O_2 et des TBARS renseigne donc sur le niveau de stress oxydant engendré par les nanomatériaux dans les cellules. Ces composés ont été dosés dans les feuilles. En effet, selon l'équipe d'Halliwell (Halliwell and Gutteridge, 1999), le MDA est formé essentiellement à partir de lipides comportant au moins trois doubles liaisons, or ce type d'acides est très peu présent dans les racines. Le stress oxydant étant un phénomène soumis à une forte régulation dans l'organisme, les mesures de stress ont été réalisées après une exposition aux nanomatériaux (50 mg/L NTC ou 100 mg/L TiO_2) de 24h pour éviter que le stress initial n'ait déjà été réprimé.

En pratique, l'extraction de ces composés est réalisée par broyage dans de l'azote liquide de 100 mg de feuilles fraîches dans 7 mL d'acide trichloroacétique (TCA à 0,1% en vol.) (Wang *et al.*, 2008b). La suspension est ensuite transférée dans un tube de 15 mL.
Dans le cas du dosage du H_2O_2 (Alexieva *et al.*, 2001), le tube est centrifugé pendant 25 min à 10 000 g. 2mL d'iodure de potassium (KI, 1M) et 0,5 mL de tampon phosphate (100 mM, pH 6,8) sont ajoutés à 0,5 mL du surnageant ainsi obtenu. Ce mélange est alors incubé à l'obscurité pendant 1 h puis dosé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 390 nm. Une gamme étalon est réalisée à l'aide de H_2O_2 à 35%.

Pour le dosage des TBARS (Heath and Packer, 1968), le tube est centrifugé pendant 10 min à 10 000 g. Puis 4 mL d'un mélange de TBA (0,5% en vol.) et de TCA (20% en vol.) sont ajoutés à 1 mL du surnageant. Cette mixture est chauffée dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min, puis la réaction est stoppée en plongeant le tube dans la glace. Le résultat est obtenu par la différence d'absorbance enregistrée à 600 nm et à 532 nm. La gamme étalon est réalisée à partir de MDA pur entre 0 et 1 mM.
Dans les deux cas, le dosage est réalisé sur 2 mL de solution dans des cuves en verres.

4.4. Impact sur la nutrition hydrominérale : dosage par chromatographie ionique

4.4.1. Principe

La chromatographie ionique ou chromatographie échangeuse d'ions est une technique de chimie analytique (Caude and Jardy, 1994). Elle date des années 1970. Elle permet de doser des espèces ioniques dans un échantillon liquide. On peut ainsi doser d'une part les cations et d'autre part les anions. Le principe de la méthode est de faire circuler une phase mobile composée de l'échantillon et d'un éluent à travers une phase stationnaire (Figure 70A). Cette phase est une colonne contenant une résine échangeuse d'ions dans laquelle sont fixés des groupements fonctionnels ionisés (chargés positivement ou négativement). Ces groupements sont soit des sulfonates ($-SO^{3-}$) pour la rétention des cations soit des ammonium tertiaire ($-NR^{3+}$) pour les anions. Lorsque la phase mobile arrive dans la colonne, les ions de l'échantillon se fixent de façon réversible sur les sites d'attache. Ainsi, par exemple, pour le dosage des anions, ceux-ci progresseront dans la colonne à des vitesses différentes selon leur charge, leur taille et leur polarisabilité, alors que les cations traverseront la colonne sans être retenus (Figure 70B). L'éluent de même charge que les ions à doser circule en permanence dans la colonne sous pression d'azote. Pour les anions, l'éluent est composé de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3, 9mM) et pour les cations, d'acide méthane sulfonique (CH_4O_3S, 30 mM). Cet éluent va décrocher les ions les uns après les autres selon leur affinité et les éluer de la colonne. Les ions sont donc séparés physiquement et parviennent au niveau du détecteur par vague d'une même espèce selon leur temps de rétention dans la colonne. La détection est réalisée par conductimétrie. Un champ électrique est appliqué entre les deux électrodes plongeant dans la solution. Les ions vont migrer vers l'une ou l'autre selon leur charge créant une résistance. Cette résistance est proportionnelle à la concentration en ions et à leur mobilité. Plus la solution est chargée, plus la conductimétrie est importante. Afin d'améliorer la sensibilité de la détection, les contre-ions des ions dosés (anions ou cations) ainsi que les ions de l'éluent sont éliminés du circuit grâce à un suppresseur chimique. Il existe donc deux types de colonnes et deux types de suppresseurs selon que l'on dose

des cations ou des anions. On peut ainsi doser les ions Cl^-, NO_3^-, NO_2^-, $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, Na^+, K^+, NH_4^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}.

Les expériences ont été réalisées à l'ECOLAB à Toulouse sur un chromatographe ionique isocratique (Dionex ICS1000) (Figure 70C).

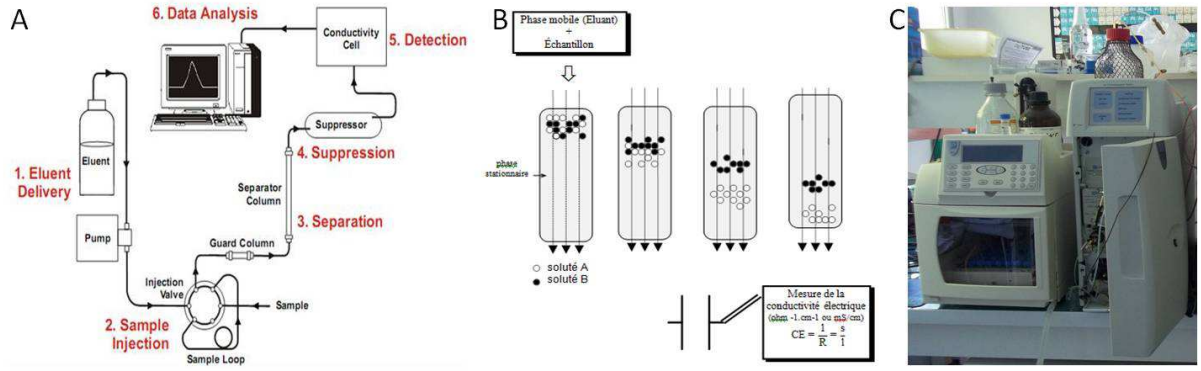


Figure 70 : A. Principe de fonctionnement d'un chromatographe ionique. B. Principe de la séparation des ions sur des colonnes échangeuses d'ions. C. Photo du chromatographe ionique de l'ECOLAB.

4.4.2. Préparation des échantillons

Les mesures étant faites sur un échantillon liquide, il faut donc une étape préalable de solubilisation des échantillons végétaux.

Les échantillons sont séchés à 60°C pendant 48 h. Ils sont ensuite découpés en petits morceaux et placés dans un creuset en porcelaine. Les creusets sont mis dans un four pour un cycle de calcination de 18h sous une température allant jusqu'à 550°C. A la fin de cette phase, des cendres sont obtenues qui sont reprises dans de l'acide chlorhydrique (HCl 0,02 M) puis la solution est évaporée. Enfin, les ions des échantillons végétaux sont repris dans 500 µL d'HCl (0,02 M) et 4,5 mL d'eau ultrapure et placés dans des flacons. Les flacons sont chargés sur un passeur par série de 45 échantillons avec une gamme étalon en tête.

5. Statistiques

Les mesures exprimées dans ce manuscrit sont la moyenne d'au moins trois réplicats et pondérées par l'erreur-type. Toutes les expériences ont été réalisées indépendamment trois fois.

Le test statistique utilisé est le test non paramétrique de Kruskall-Wallis (ou de Mann et Whitney dans le cas de deux échantillons). Ce test a été choisi puisque les données ne suivaient pas une loi normale et que les échantillons sont indépendants (non appariés). De plus, ce test est particulièrement bien adapté à la biologie puisqu'il travaille à partir de rangs qui atténuent les effets d'une grande variabilité. Les valeurs expérimentales sont classées, quelle que soit la modalité, et un rang est attribué à chacune. Le seuil de significativité est fixé à 0,5% et est signalé par un astérisque (*). Ce test a été réalisé à l'aide du logiciel StatView.

6. Synthèse du chapitre

SYNTHESE DU CHAPITRE

➢ Le tableau ci-dessous regroupe les paramètres étudiés lors de cette étude ainsi que les techniques mises en œuvre pour chacun de ces paramètres. Y figurent également les nanomatériaux et les plantes auxquels ont été appliquées ces techniques (Tableau 6).

Tableau 6 : Résumé des paramètres étudiés et des techniques employées (B, blé; C, colza)

Caractérisation des nanomatériaux			
Diamètre nominal	MET, MEB	TiO_2/NTC	
Surface spécifique	BET	TiO_2/NTC	
Phase cristalline	DRX	TiO_2	
Diamètre hydro.	DLS	TiO_2	
Potentiel zeta	ELD	TiO_2	
Localisation et quantification des nanomatériaux dans les tissus végétaux			
Localisation	µ-XRF	TiO_2 (très sensible)	B/C
	XAS	TiO_2 (coord. *in situ*)	B
	Radiographie	NTC	B/C
	MEB-EDS	TiO_2 (loc//identification)	B
	MET	TiO_2/NTC (échelle cellulaire)	B
Quantification	ICP-MS	TiO_2 feuilles	B
	µ-PIXE/RBS/STIM	TiO_2 racines	B/C
	Radiographie	NTC feuilles	B/C
Impact des nanomatériaux sur les végétaux			
Développement	Germination	TiO_2/NTC	B/C
	Longueur racines		B/C
	Biomasse		B/C
	ETP		B/C
Métabolisme	Pigments chlorophylliens	TiO_2/NTC	B
	Dosage H_2O_2		B
	Peroxydation lipidique		B
	Chromatographie ionique	TiO_2	B

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES NANOMATERIAUX

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES NANOMATERIAUX 97

1. Les nanoparticules de TiO_2 99
   1.1. Caractérisation des nanopoudres de TiO_2 99
   1.2. Optimisation de la dispersion des NPs de TiO_2 100
   1.3. Diamètre hydrodynamique 104
   1.4. Charge de surface 105
   1.5. Dimensions des NPs de TiO_2 en suspension 106
2. Les nanotubes de carbone 107
   2.1. Caractérisation des poudres de NTC : surface spécifique 107
   2.2. Optimisation de la dispersion des NTC 108
   2.3. Dimensions des NTC en suspension 108
3. Synthèse du chapitre 110

Comme indiqué dans la partie matériel et méthodes, les nanopoudres sont soit d'origine commerciale, soit ont été synthétisées dans des laboratoires avec lesquels nous collaborons (SPAM et CIRIMAT). Nos partenaires nous fournissent des nanopoudres qu'il convient de mettre en suspension pour exposer les plantes. Seuls les DWCNTs, nous sont fournis sous forme de suspension.

1. Les nanoparticules de TiO_2

1.1. Caractérisation des nanopoudres de TiO_2

Un des objectifs de ce travail étant d'établir des corrélations entre les caractéristiques physico-chimiques des NPs et leurs impacts sur les végétaux, un panel de NPs de TiO_2 a été choisi, présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes. Ainsi, nous disposons de particules dont le diamètre nominal varie de 12 à 700 nm. D'après la définition actuellement admise, celles dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm sont des NPs, celles dont le diamètre est supérieur à 100 nm sont des microparticules. Leur phase cristalline est soit anatase, soit rutile.

Parmi ces particules, quatre ont été caractérisées et déjà utilisées lors de la thèse d'Angélique Simon-Deckers : A12, R20, A140 et R700. Les autres lots ont été caractérisés dans le cadre du présent travail de thèse.

1.1.1. Surface spécifique et diamètre (BET)

Les surfaces spécifiques des particules ont été mesurées grâce à la méthode BET (Brunauer *et al.*, 1938). A partir de la mesure de la surface spécifique, il est possible de calculer le diamètre de la particule :

$$\emptyset\, BET = \frac{6}{ssa \times \rho}$$

Avec ssa, la surface spécifique (m^2/g)

ρ , la densité volumique du titane : 3,9 g/cm^3

$\emptyset\, BET$, en µm

Le diamètre obtenu est différent du diamètre mesuré en MET car la mesure de la surface spécifique tient compte de la porosité de la surface de la particule. Le diamètre BET est donc surestimé par rapport au diamètre nominal de la particule mesuré en microscopie. Plus une particule est petite, plus sa surface spécifique est élevée.

Les surfaces spécifiques des particules utilisées dans cette étude varient de 2 à 92 m^2/g (Tableau 7). Les diamètres calculés à partir de ces surfaces spécifiques sont proches des valeurs mesurées en MET, suggérant que les particules étudiées sont peu poreuses.

Tableau 7 : Surface spécifique et diamètre estimé, selon la méthode BET (en gris, les données issues de la thèse d'Angélique Simon-Deckers)

Appellation	Surface spécifique (m^2/g)	Diamètre estimé BET (nm)
A12	92 ± 3	17
R20	73	23
A25	50 ± 0	31
R35	39 ± 0	39
A140	10 ± 0	154
R700	2 ± 0	752

1.1.2. Phase cristalline

La phase cristalline (Figure 71A) a été identifiée à partir des diffractogrammes obtenus par DRX sur les poudres de particules (Figure 71B).

A

Appellation	Phase cristalline
A12	95% anatase
R20	90% rutile
A25	89% anatase
R35	77% rutile
A140	100% anatase
R700	96% rutile

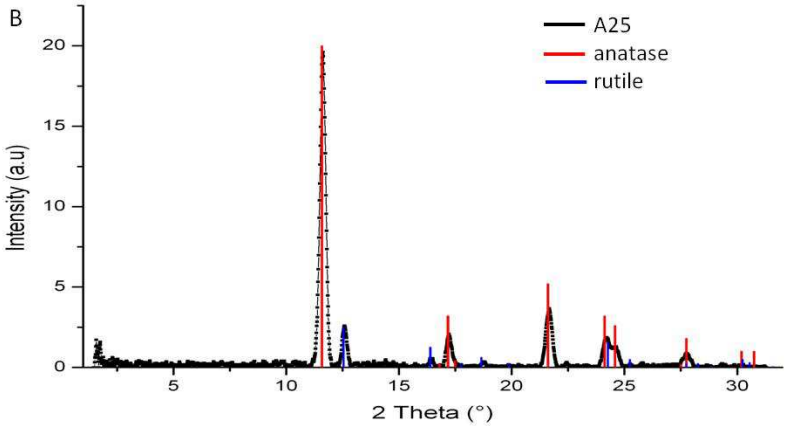


Figure 71 : A. Phase cristalline des particules de TiO_2 par DRX (en gris, les données issues de la thèse d'Angélique Simon-Deckers). B. Exemple de diffractogramme issu de l'analyse de la nanopoudre de A25.

On constate que les nanopoudres sont majoritairement constituées des deux phases : anatase et rutile, en mélange avec une des deux phases largement majoritaire. Seule la microparticule A140 est uniquement constituée d'une phase pure (anatase).

1.2. Optimisation de la dispersion des NPs de TiO_2

Nous nous sommes également attachés à optimiser l'état de dispersion des suspensions de nanomatériaux, dans le but d'obtenir des NPs les plus isolées possibles.

1.2.1. Sonification en milieu simple

Pour déterminer l'état d'agglomération des suspensions, nous nous sommes basés sur la détermination du diamètre hydrodynamique des particules par DLS. Des travaux antérieurs menés au

laboratoire avaient démontré que les NPs de TiO_2 (de type A25) sont efficacement mises en suspension par sonification à l'aide d'une sonde ultrahaute puissance durant 1 h (4°C) en mode pulsé (1s on/1s off), dans de l'eau ultrapure.

Les mesures par DLS sont sensibles à la concentration de NPs dans la suspension. Ainsi, une concentration trop faible de NPs génère des fluctuations d'intensité dues à la diffusion des particules dans la suspension. Ces fluctuations ne sont pas prises en compte dans le modèle et sont interprétées par l'appareil de mesure comme de grosses particules. A l'inverse, une concentration trop élevée donne naissance à des phénomènes de diffusion multiple, également non pris en compte dans le modèle. Ces diffusions multiples mènent à une diminution du diamètre apparent des particules et à une plus forte polydispersité de la suspension (www.malvern.com). Dans un premier temps, nous avons donc déterminé quelle était la concentration optimale de la suspension de NPs qui permettait d'obtenir des mesures précises de diamètre hydrodynamique.

Ces tests ont été réalisés avec les NPs A25, qui sont mises en suspension à différentes concentrations. Leur diamètre hydrodynamique a été mesuré par DLS à l'aide d'un Zetasizer (Tableau 8). A 10 mg/L, la valeur annoncée par le Zetasizer surestime le diamètre attendu (1400 nm) alors qu'à 2000 mg/L, elle le sous-estime (13 nm). Nous avons ainsi déterminé que la concentration la plus appropriée pour obtenir des mesures fiables est 50 mg/L. A cette concentration, le diamètre hydrodynamique est semblable au diamètre nominal. Toutes les mesures de diamètre hydrodynamique ont donc été réalisées à cette concentration par la suite.

Tableau 8 : Essais pour déterminer la concentration optimale des suspensions de TiO_2 pour des mesures en DLS. Les mesures rapportées sont exprimées en nombre.

Concentration en TiO_2 (mg/L)	10	50	100	500	1000	2000
Diamètre hydrodynamique (nm)	1400,6	24,2	38,7	43,1	66,6	12,5

Lors de tests d'impact de polluants sur les végétaux, il convient d'exposer les plantes dans un milieu nutritif limitant au maximum le stress engendré sur la plante. En vue de l'exposition des plantes, cette suspension de NPs a été diluée dans du milieu de culture et le diamètre hydrodynamique des NPs a été mesuré (Tableau 9). La mesure prouve que les NPs s'agglomèrent au contact du milieu de culture. Nous avons cherché à éviter cette réagglomération, en variant le temps de sonification et le pH du milieu de culture. Même après 3 h de sonification et en abaissant le pH à 3, les suspensions de NPs ne sont pas stables (Tableau 9).

Tableau 9 : Essais de dispersion des NPs de TiO_2 A25 dans de l'eau ultrapure et dans du Hoagland (Hoag.) à différents pH et temps de sonification. Diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS.

	Sonification dans…	Dilution dans…	Diamètre hydro. (nm)	Ecart-type	% pop.
Conditions initiales	H_2O	H_2O	27	7	100
Changement de pH	H_2O	Hoag. pH3	5090	439	100
		Hoag. pH4	4775	425	100
		Hoag. pH 5,5	2173	1015	100
Durée de sonification	H_2O 2h	Hoag.	2022	688	100
	H_2O 3h	Hoag.	1009	599	100

Une solution permettant d'obtenir des suspensions stables de NPs est l'utilisation de surfactants qui, en s'adsorbant sur la surface des NPs, induisent une répulsion électrostatique et/ou stérique des NPs entre elles.

1.2.2. Test de surfactants biocompatibles

Plusieurs surfactants avaient été testés lors de la thèse d'Angélique Simon-Deckers, pour des expositions de cultures cellulaires ou de bactéries mais aucune substance n'avait permis d'obtenir des résultats satisfaisants (Simon-Deckers, 2008). Les NPs étaient bien dispersées dans l'eau ultrapure mais s'agglomeraient dans les milieux de culture. De nouveaux essais ont été réalisés à partir d'une suspension de NPs de TiO_2 A25 pour essayer de trouver un dispersant convenable pour les NPs dans le milieu de culture pour végétaux (Hoagland).

Les premiers tests ont porté sur l'utilisation de l'acide oxalique, de la polyvinylpyrrolidone (PVP) et du sorbitol. L'acide oxalique est un acide organique (RCOOH) sécrété par les végétaux dans la rhizosphère et que l'on retrouve naturellement à proximité des racines. Deux concentrations ont été testées : 0,02 M qui est la concentration de l'acide oxalique dans les sols (Roussel-Debet *et al.*, 2000) et une concentration plus faible de 0,001 M selon French *et al*. (French *et al.*, 2009). La PVP est un composant utilisé dans les produits phytosanitaires en tant qu'agent dispersant. Elle est soluble dans l'eau ainsi que dans les solvants polaires. Des concentrations de 0,1, 1 et 10 g/L ont été choisies. Enfin, le sorbitol, un polyol contenu dans certains végétaux, a été testé à la même concentration que l'acide oxalique (0,001 M). Ces substances ont été ajoutées à 10 mL d'une suspension de NPs de TiO_2 A25 à 10 mg/mL dans l'eau ultrapure juste avant la sonification. Puis les suspensions ainsi obtenues ont été diluées dans de l'eau ultrapure ou du Hoagland. Les diamètres hydrodynamiques des suspensions ont été mesurés par DLS (Tableau 10).

Tableau 10 : Essais de dispersion des NPs de TiO_2 A25 à l'aide de surfactants biocompatibles dans de l'eau ultrapure à pH 5,5 ou dans du Hoagland (Hoag.). Diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS.

Sonification dans H_2O + …	Dilution dans…	Diamètre hydro. (nm)	Ecart-type	% pop.
Acide oxalique	H_2O	1536	638	100
0,001 M	Hoag.	1234	472	100
Acide oxalique 0,02 M	Agglomération instantanée des NPs après sonification			
PVP	H_2O	67/286	23/120	59/41
0,1 g/L	Hoag.	1933	237	100
PVP	H_2O	46/268	17/125	85/15
1 g/L	Hoag.	1009	599	100
PVP	H_2O	245	54	100
10 g/L	Hoag.	2385	902	100
Sorbitol	H_2O	41/267	21/127	94/4
0,001 M	Hoag.	853	264	100

Les dispersants envisagés n'amènent aucune amélioration de l'état d'agglomération des NPs dans le milieu de culture : les diamètres hydrodynamiques restent proches du micromètre. Un essai avait été réalisé avec de la GA dans la thèse d'Angélique Simon-Deckers. Le diamètre

hydrodynamique des NPs A25 s'élevait à 204 nm dans l'eau ultrapure et était supérieur à 1 µm dans le Hoagland. La GA n'est donc pas non plus un dispersant efficace pour les NPs de TiO_2. Ainsi, parmi les méthodes mises en œuvre pour améliorer l'état de dispersion des NPs de TiO_2 dans le Hoagland, aucune n'a été efficace. Seule l'eau ultrapure assure que les NPs restent en suspension.

Cependant l'exposition de plantes à des NPs en suspension dans de l'eau ultrapure peut induire un stress osmotique au niveau de leurs racines. Pour diminuer au mieux ce stress tout en maintenant un état de dispersion optimal des NPs, nous avons essayé de moduler la composition de la solution d'exposition.

1.2.3. Test de solutions nutritives

Nous avons ajouté des minéraux à l'eau ultrapure pour limiter le choc osmotique et fournir à la plante les nutriments nécessaires à sa croissance. L'eau d'Evian (en mg/L. Ca^{2+} : 80, Mg^{2+} : 26, Na^+ : 6,5, K^+ : 1, Si : 15, HCO_3^- : 360, SO_4^{2-} : 12,6, Cl^-: 6,8, NO_3^-: 3,7. pH 7,2. Résidu sec à 380°C: 309 mg/L) et le sérum physiologique (NaCl 0,9%) ont été testés (Tableau 11). Dans ces expériences, les nanopoudres étaient sonifiées directement dans ces milieux nutritifs. Nous avons également testé différentes concentrations de sorbitol.

Tableau 11 : Test de conditions limitant le choc osmotique. Diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS

Sonification dans…	Dilution dans…	Diamètre hydro. (nm)	Ecart-type	% Population
Eau d'Evian	H_2O	1668	190	
	Hoag.	746	331	
Serum physiologique	H_2O	1060	499	
	Hoag.	1919	920	
H_2O	Sorbitol 0,001 M	42 / 222	13 / 69	99 / 1
H_2O	Sorbitol 0,01 M	59 / 263	31 / 157	93 / 7
H_2O	Sorbitol 0,1 M	46 / 242	23 / 119	98 / 2
H_2O	Sorbitol 0,5 M	37	18	
H_2O	Sorbitol 1 M	306	107	

D'après les mesures, l'eau d'Evian et le sérum physiologique sont à l'origine du même phénomène d'agglomération que le Hoagland, certainement du fait de leur salinité. Le sorbitol appliqué à des concentrations de 0,001 à 0,5 M permet de maintenir un bon état de dispersion. Son intérêt quant à la croissance des végétaux a donc été testé en mettant en culture des plants de colza dans de l'eau ultrapure, du sorbitol à 0,01 M, 0,1 M et 1 M et enfin dans du Hoagland (Figure 72).

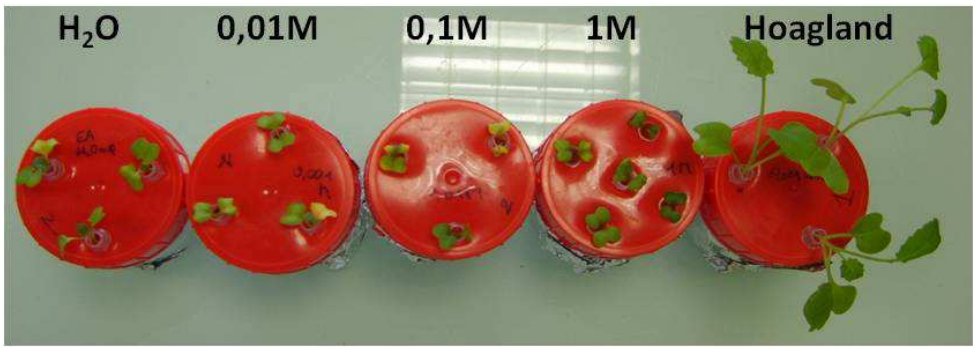


Figure 72 : Croissance comparée de plantules de colza en hydroponie après 15 jours dans différents milieux de culture

L'ajout de sorbitol au milieu de culture n'entraîne aucune amélioration visible de la croissance des végétaux. De plus, ce substrat pourrait être utilisé comme source nutritive par des bactéries, conduisant à la contamination des solutions d'exposition des plantes. Nous avons donc considéré que son ajout n'amènerait pas d'amélioration des conditions d'exposition des plantes.

L'état d'agglomération des suspensions après les différents essais a été synthétisé sur la Figure 73.

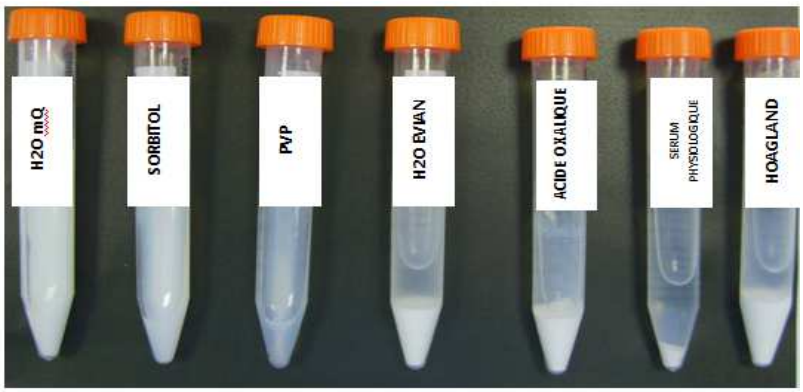


Figure 73 : Observation de l'état de dispersion des NPs de TiO_2 A25 (10 mg/mL) dans les différentes conditions testées

En l'absence de conditions optimales (NPs dispersées et milieu nutritif n'induisant pas de stress pour la plante), le choix s'est donc porté sur deux conditions d'exposition : dans de l'eau ultrapure et dans du Hoagland. L'exposition dans l'eau ultrapure permet une exposition à des NPs à l'état dispersé mais ne fournira pas les nutriments nécessaires à la croissance des végétaux pendant la période d'exposition. L'exposition dans le Hoagland permet la croissance des végétaux mais induit l'agglomération des NPs.

Les différents résultats décrits dans ce chapitre ont été publiés dans les proceedings de la conférence nanoSAFE 2010 dans Journal of Physics : Conference Series (Annexe 5).

1.3. Diamètre hydrodynamique

Ces conditions d'exposition choisies, le diamètre hydrodynamique de toutes les particules de TiO_2 a été évalué dans l'eau ultrapure et dans le Hoagland (Figure 74).

A

Appellation	H_2O	Hoagland
A12	229 ± 48	> 1000
R20	213 ± 7 à 95% > 1000 à 5%	> 1000
A25	27 ± 7	> 1000
R35	> 1000	> 1000
A140	220 ± 81	370 ± 181
R700	264 ± 136 à 27% > 1000 à 73%	> 1000

B

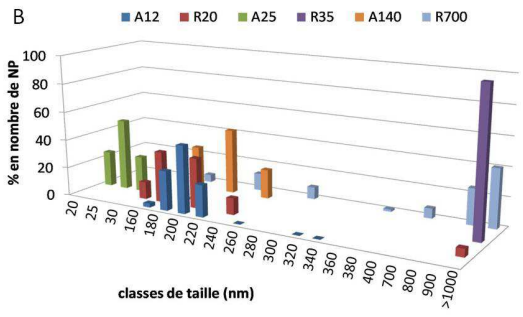


Figure 74 : Diamètres hydrodynamiques (nm) mesurés par DLS de la gamme de particules de TiO_2 dans l'eau ultrapure (A; B) et dans le Hoagland (A). Les chiffres donnés correspondent au diamètre hydrodynamique moyen ± écart-type et lorsqu'il existe plusieurs populations, le pourcentage de la population concerné par ce diamètre est précisé.

Parmi les NPs testées, A25, A140 et R700 ont un diamètre hydrodynamique dans l'eau proche de leur diamètre nominal suggérant une bonne dispersion. En revanche, les autres particules ne sont pas optimalement dispersées par la sonification : A12 et R20 ont un diamètre hydrodynamique d'environ 200 nm et R35 atteint une taille sub-micronique en suspension dans l'eau ultrapure.

Il est possible que les nanopoudres qui nous ont été fournies contiennent des agrégats de NPs. Selon la définition d'Oberdorster et al. (Oberdorster *et al.*, 2007), un agglomérat est composé de NPs liées entre elles par des liaisons faibles. En revanche, un agrégat est composé de NPs liées par des liaisons covalentes. Le recuit des NPs, utilisé pour leur purification, peut conduire à leur agrégation. Si des agglomérats de NPs peuvent être efficacement cassés par les ultrasons, conduisant à des NPs bien dispersées, l'énergie nécessaire à la rupture des agrégats est très élevée. Il est donc possible que la sonification, même à haute puissance, ne permette pas de rompre ces agrégats, ce qui peut expliquer les diamètres hydrodynamiques élevés que nous avons mesuré sur certaines suspensions de NPs.

Dans le Hoagland, hormis A140, toutes les particules testées s'agglomèrent : la totalité de la population présente un diamètre hydrodynamique supérieur au micromètre.

1.4. Charge de surface

La charge de surface acquise par les nanomatériaux grâce aux ions contenus dans les deux milieux d'exposition a été évaluée à travers la mesure de leur potentiel zeta, mesuré à l'aide d'un Zetasizer. Ce type d'appareil travaille à partir du postulat que les particules sont sphériques. Les mesures ont donc uniquement été réalisées sur les particules de TiO_2. Le potentiel zeta a été mesuré sur des suspensions de NPs préparées dans l'eau ultrapure et dans le Hoagland (pH 5,5 pour les deux) (Figure 75A). L'évolution du potentiel zeta en fonction du pH a aussi été étudiée pour obtenir le point isoélectrique, point auquel la charge de surface est nulle et donc la probabilité d'interaction et d'agglomération est maximale (Figure 75B). De plus, on remarque que la salinité de l'eau déplace le point isoélectrique vers les hauts pH.

A

	Potentiel zeta H_2O (mV)	Potentiel zeta Hoag. (mV)	pI H_2O
A12	-12,6 ± 1,0	-1,2 ± 0,2	5,03
R20	-19,5 ± 0,9	-0,8 ± 0	3,65
A25	-10,5 ± 2,6	-1,2 ± 0,2	4,92
R35	-16,7 ± 2,2	-0,8 ± 0,2	4,12
A140	-37,7 ± 7,2	-0,9 ± 0,1	3,43
R700	-26,4 ± 5,1	-1,3 ± 0,2	3,73

B

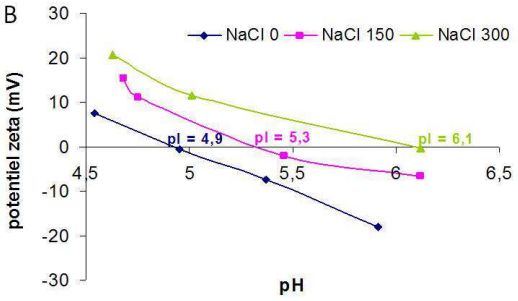


Figure 75 : A. Potentiel zeta des particules de TiO_2 dans l'eau et le Hoagland et point isoélectrique (pI) dans l'eau. B. Evaluation du potentiel zeta d'une NP de TiO_2 (A25) dans l'eau ultrapure en fonction du pH et influence de la salinité sur le potentiel zeta après adjonction de NaCl (µmol/L).

Les potentiels zeta de toutes les particules de TiO_2 testées en suspension dans l'eau ultrapure, hormis A140, sont compris entre -30 mV et -10 mV. Or, dans cette zone les forces de répulsion sont faibles et les particules ont tendance à s'agglomérer (Bratby, 2006). Ceci peut expliquer les diamètres hydrodynamiques élevés mesurés par DLS pour certaines particules ainsi que les phénomènes

d'agglomération des particules dans l'eau. La microparticule A140 est bien dispersée dans l'eau ultrapure (diamètre hydrodynamique proche du diamètre nominal). Cette dispersion est corrélée avec un potentiel zeta élevé en valeur absolue.

Lorsque les suspensions de particules sont diluées dans le Hoagland, les valeurs absolues des potentiels zeta sont très proches de zéro ce qui explique l'agglomération quasi-instantanée de toutes les particules dans ce milieu.

Lorsque les plantes sont mises en contact avec les suspensions de particules préparées dans de l'eau ultrapure, nous avons observé l'agglomération progressive des NPs au cours de l'exposition, même lorsque la suspension de particules était stable en début d'expérience. Les pI des particules, dans l'eau, sont compris entre 3,4 et 5,0. Le pH de l'eau ultrapure et du Hoagland diminue légèrement pendant le temps de l'exposition (-0,5 pH). Cette acidification du milieu due à la présence des végétaux peut également expliquer une partie de l'agglomération en fin d'expérience des particules présentant un pI proche de 5 (A12 et A25). Les plantes sont aussi à l'origine de la sécrétion d'exsudats racinaires qui peuvent modifier la stabilité des suspensions des nanomatériaux.

1.5. Dimensions des NPs de TiO_2 en suspension

Enfin, les suspensions de NPs ont été observées au MET et au MEB pour déterminer précisément leur forme et leurs dimensions après la mise en suspension (Figure 76 ; Tableau 12).

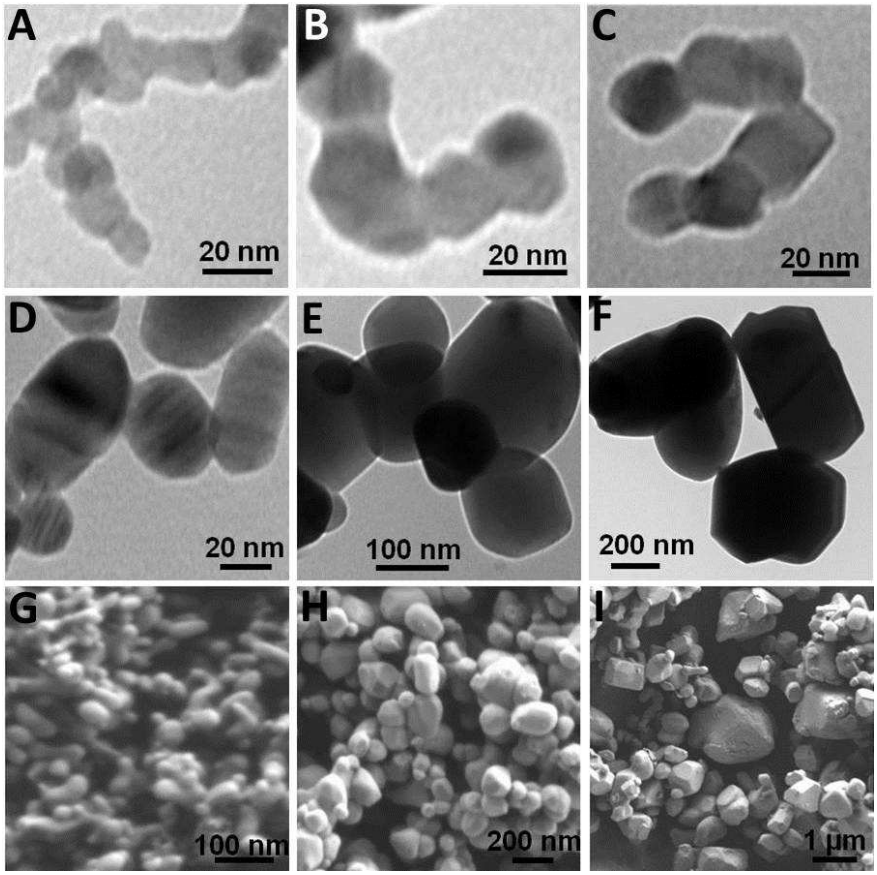


Figure 76: Observations en microscopie électronique à transmission (A-F) et à balayage (G-I) des particules de TiO_2 : A12 (A), R20 (B), A25 (C), R35 (D, G), A140 (E, H) et R700 (F, I).

Tableau 12 : Taille et forme des particules de TiO_2 (calculées à partir d'observations en MET de 100 à 200 particules pour chaque type)

Appellation	Fournisseur	Données fournisseur	Diamètre mini (nm)	Diamètre maxi (nm)	Diamètre moyen (nm)	Ecart-type (nm)	Forme
A12	CEA-SPAM		10,7	18,3	**14,3**	1,8	sphérique
R20	CEA-SPAM		13,4	32,7	**22,1**	3,8	sphérique
A25	Evonik	Degussa Aeroxide P25 – 25 nm	14,3	39,6	**25,2**	5,7	sphérique
R35	CEA-SPAM		16,6	60,7	**36,0**	7,8	sphérique
A140	Sigma	Sigma T8141 - <44 µm, pure anatase	62,5	256	**139,6**	38,7	sphérique
R700	Sigma	Aldrich 224227 - <5 µm	208	1587	**655,1**	232,1	sphérique

Notre gamme de particules de TiO_2 est constituée de particules sphériques dont le diamètre moyen varie de 14 à 655 nm.

En complément de ce panel de particules, nous avions initialement prévu de travailler avec un lot de NPs dont le fournisseur (NanoE) indiquait un diamètre nominal de 50 nm. Il s'est avéré que les particules avaient un diamètre moyen de 215 nm, et une distribution de diamètre très large (allant de 29 à 602 nm). D'autre part, les particules présentaient des formes très variables. Ces NPs ont, de ce fait, été rapidement écartées de l'étude.

2. Les nanotubes de carbone

Nous souhaitons dans cette étude étudier l'influence du diamètre des NTC sur leur impact et sur leur accumulation dans les plantes. Nous avons ainsi choisi de travailler avec des MWCNTs et des DWCNTs. D'autre part, l'état de surface des nanotubes peut également modifier leur impact et leur accumulation dans les plantes. Nous avons donc choisi de travailler avec des DWCNTs bruts de synthèse ou ayant subi un traitement acide supplémentaire. Ce traitement acide (HNO_3) entraîne le greffage de fonctions oxygénées en surface des NTC, les rendant ainsi plus hydrophiles (Flahaut *et al.*, 2003).

2.1. Caractérisation des poudres de NTC : surface spécifique

La surface spécifique des tubes a été évaluée par la méthode BET (Tableau 13). Pour les DWCNTs, la surface spécifique est élevée et atteint 985 m²/g. Les MWCNTs ont une surface spécifique de 82 m²/g, c'est-à-dire équivalente à celles des plus petites NPs de TiO_2. Dans les suspensions de DWCNTs, fournies par nos collaborateurs, 18% des NTC sont des simple-paroi et 5% sont triple-parois, le reste (77%) se présente sous forme de DWCNTs.

Tableau 13 : Surface spécifique (données sur les DWCNTs issues de Flahaut et al., 2003 ; données sur les MWCNTs issues de la thèse d'Angélique Simon-Deckers)

Appellation	Surface spécifique (m^2/g)
DWCNT brut	985
DWCNT oxydé	
MWCNT	82

2.2. Optimisation de la dispersion des NTC

La mise en suspension des NTC a déjà été étudiée dans la thèse d'Angélique Simon-Deckers pour l'exposition de bactéries et de cellules humaines. L'ajout de 0,25% de gomme arabique (GA) dans la suspension avant la sonification permettait d'obtenir des tubes bien dispersés et une suspension stable dans le temps. Dans notre étude, pour la dispersion des NTC dans le Hoagland, un dispersant supplémentaire a été envisagé : les acides humiques (AH). Un bon dispersant doit disperser efficacement les particules en perturbant le moins possible le milieu de culture et les organismes. Les AH sont présents dans les sols naturels et dans les eaux de surface. Ainsi, dans les eaux de surface, on retrouve entre 1 et 100 mg/L de AH (Steinberg *et al.*, 2006). La GA, quant à elle, est un polysaccharide de nature végétale.

Les tests de dispersion effectués ont confirmé l'efficacité de la GA pour la dispersion des NTC (Figure 77A) même dans le milieu de Hoagland. Les AH sont également très efficaces et permettent la préparation de suspensions stables de NTC (Figure 77B). L'essentiel des tests a finalement été réalisé avec des NTC dispersés dans la GA. Les AH ont été utilisés pour étudier l'accumulation des NTC dans les végétaux, pour mimer au mieux les caractéristiques d'une solution de sol.

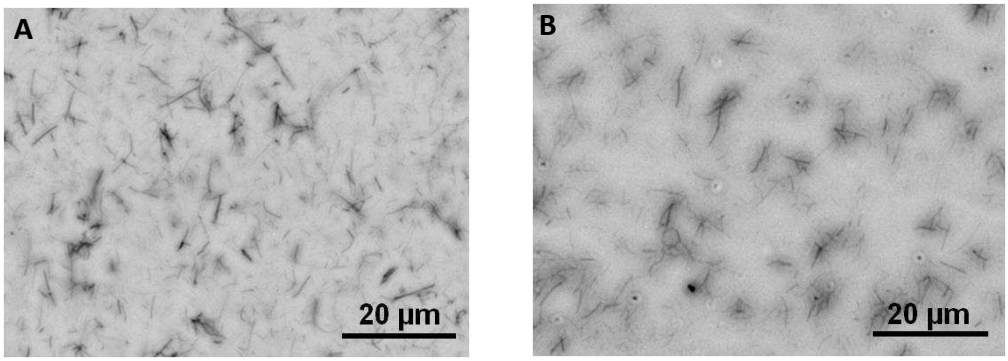


Figure 77 : Clichés en microscopie optique d'une suspension de MWCNTs après 30 min de sonification dans de l'eau ultrapure contenant 0,25% de GA (A) ou 0,25% de AH (B).

2.3. Dimensions des NTC en suspension

Il a été démontré que la sonification induit la rupture des NTC (Glory *et al.*, 2007). Leur longueur dépend donc de la durée et de l'intensité de la sonification. La longueur des NTC a été mesurée après différentes durées de sonification (Tableau 14).

Tableau 14 : Influence du temps de sonification sur la longueur moyenne des NTC (ici MWCNT), observations en microscopie optique sur 100 à 500 tubes.

	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	1h	2h	3h	8h
Longueur moy.	**6,0**	**7,2**	**5,6**	**3,95**	**3,65**	**3,24**	**2,47**	**2,22**	**1,77**	**1,0**
Ecart-type	3,1	3,9	2,4	2,5	2,0	1,8	1,2	1,0	0,8	0,6
Longueur min.	1,7	2,4	1,8	0,9	0,9	0,9	0,6	0,5	0,4	0,1
Longueur max.	16,4	20,1	15,1	20,8	13,7	12,6	7,8	6,2	5,4	5,0

Le choix s'est porté sur l'utilisation de NTC courts, le temps de sonification a donc été fixé à 8 h pour les MWCNTs (soit un temps effectif de 16h avec une alternance de 1s de pulse et 1s de repos).

La distribution de longueur des NTC en suspension après sonification est détaillée dans le Tableau 15. Les MWCNTs se trouvent être plus courts que les DWCNTs.

Tableau 15 : Distribution de longueur des NTC, déterminée par observation en microscopie optique (données sur les DWCNTs issues de Flahaut et al., 2003)

Appellation	Long. Min (µm)	Long. Max (µm)	Long. Moy (µm)	Ecart-type (µm)
DWCNT brut DWCNT oxydé	2	10		
MWCNT	0,1	5	1	0,6

Le diamètre moyen des différents NTC a également été étudié par microscopie. Le diamètre extérieur moyen des DWCNTs dont nous disposons est de 2 nm (Tableau 16, Figure 78A,B) ; celui des MWCNTs est de 54 nm (Tableau 16, Figure 78C,D).

Tableau 16 : Taille et forme des NTC par MET (données sur les DWCNTs issues de Flahaut et al., 2003 ; données sur les MWCNTs issues de la thèse d'Angélique Simon-Deckers)

Appellation	Fournisseur	Diam. Min (nm)	Diam. Max (nm)	Diam. Moy (nm)	Forme
DWCNT brut	CIRIMAT	1,23	3,23	2,05	Double-parois
DWCNT oxydé	CIRIMAT				
MWCNT	CEA-SPAM	7	180	54	Multi-parois

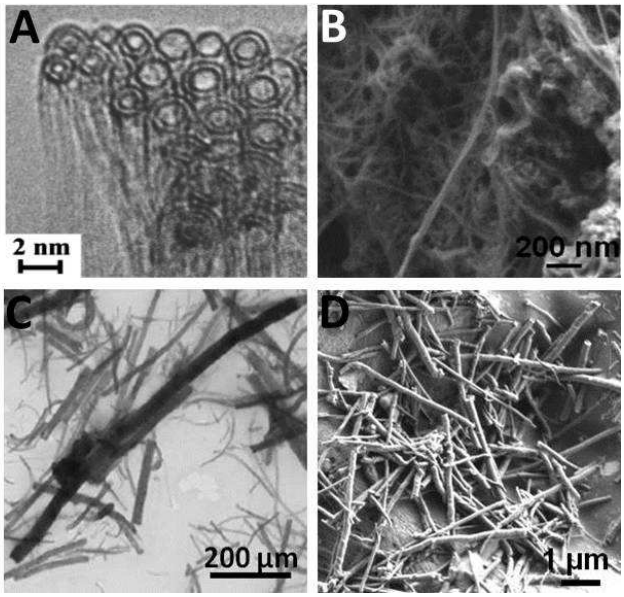


Figure 78 : Observations en microscopie électronique des NTC. A. DWCNTs en HRTEM (issue de Flahaut et al., 2003), B. DWCNTs en MEB. C. MWCNTs en MET. D. MWCNTs en MEB.

3. Synthèse du chapitre

SYNTHESE DU CHAPITRE

➢ Les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux étudiés sont réunies dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Résumé des caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux étudiés *(anat. anatase, rut. rutile, ssa. surface spécifique en BET, hydro. hydrodynamique, pI. potentiel isoélectrique, Ø diamètre, long. longueur)*

	Taille (nm) MET	Phase cristalline	ssa (m^2/g)	Diamètre hydro H_2O (nm)	Potentiel zeta H_2O (mV)	pI
A12	14,3	95% anat.	92	229	-12,6	5,03
R20	22,1	90% rut.	73	213	-19,5	3,65
A25	25,2	89% anat.	50	27	-10,5	4,92
R35	36,0	77% rut.	39	2311	-16,7	4,12
A140	139,6	100% anat.	10	220	-37,7	3,43
R700	655,1	96% rut.	2	1151	-26,4	3,73
DWCNTb DWCNTox	Ø 2 long. 2 à 10 µm	77% DWCNT	985	-	-	-
MWCNT	Ø 54 long. 1 µm	n.d.	82	-	-	-

➢ L'exposition des végétaux aux nanomatériaux se fera en parallèle dans l'eau ultrapure pour limiter l'agglomération des NPs et dans le Hoagland pour favoriser la croissance des végétaux.

➢ L'étude a été réalisée en fonction d'une concentration massique en nanomatériaux (mg/L). Les résultats pourraient également être exprimés en fonction de la surface déployée par les nanomatériaux. Une conversion de la masse en surface est donc fournie dans le Tableau 18, en considérant les NPs bien dispersées.

Tableau 18 : Correspondance des concentrations en masse (mg/L) en concentrations en surface (m^2/L)

	10 mg/L	**50 mg/L**	**100 mg/L**
A12	0,92	4,6	9,2
R20	0,73	3,7	7,3
A25	0,50	2,5	5,0
R35	0,39	2,0	3,9
A140	0,1	0,5	1,0
R700	0,02	0,1	0,2
DWCNTb DWCNTox	9,85	49,3	98,5
MWCNT	0,82	4,1	8,2

CHAPITRE 4 : IMPACT DES NANOPARTICULES DE TiO_2

CHAPITRE 4 : IMPACT DES NANOPARTICULES DE TiO_2 113

1. Pénétration et translocation des NPs de TiO_2 dans le blé 115
2. Influence du diamètre des NPs de TiO_2 sur leur accumulation et leur phytotoxicité sur le blé 131
   - 2.1. Pénétration racinaire du titane chez le blé cultivé en hydroponie 131
   - 2.2. Transfert du titane vers les parties aériennes du blé 135
   - 2.3. Coordination du titane 136
   - 2.4. Impact des NPs de TiO_2 sur le développement et la physiologie du blé 140
   - 2.5. Discussion des résultats 144
3. Influence de l'espèce végétale sur l'accumulation et la phytotoxicité des NPs de TiO_2 154
   - 3.1. Exposition racinaire du colza aux NPs de TiO_2 155
   - 3.2. Influence de la voie d'exposition : exposition aérienne du colza à des NPs de TiO_2 158
   - 3.3. Discussion des résultats 159
4. Influence du substrat sur l'accumulation de NPs de TiO_2 dans le blé 162
   - 4.1. Devenir des NPs de TiO_2 dans différents sols 163
   - 4.2. Quantification du titane dans les racines de blé cultivé sur sols 166
   - 4.3. Répartition du titane dans les racines de blés cultivés sur sols 166
   - 4.4. Coordination du titane 168
   - 4.5. Discussion 170
5. Synthèse du chapitre 171

Une fois les nanomatériaux caractérisés, les végétaux ont été exposés à des suspensions de NPs de TiO_2. Le choix s'est principalement porté sur une exposition racinaire simulant une contamination du substrat des végétaux. Au début de ces travaux, très peu de données étaient disponibles sur l'impact de nanomatériaux sur les végétaux. Les premières études consistent donc à étudier les effets d'une telle contamination dans un milieu très simplifié. Typiquement, les expositions sont faites en hydroponie (eau ou milieu de culture). Le blé qui est une plante robuste et facilement cultivable a fait l'objet de recherches plus poussées. Puis, l'étude a été étendue au colza, une espèce dicotylédone, sur laquelle un essai d'exposition aérienne a également été envisagé. Enfin, le substrat d'exposition a été complexifié avec des expositions racinaires de blé sur du sable et des sols volontairement contaminés par des NPs.

L'accumulation et la translocation des nanomatériaux des racines vers les parties aériennes ont été étudiées par un ensemble de techniques permettant de cartographier la répartition du titane dans les tissus végétaux (MEB, MET, µ-XRF, µ-PIXE) et de réaliser une analyse chimique *in situ* (EDS et XAS). Le titane accumulé dans les végétaux et dans les substrats a été quantifié par µ-PIXE/RBS et par ICP-MS. Enfin, l'impact des expositions aux NPs de TiO_2 sur le développement et la physiologie des plantes a été évalué.

1. Pénétration et translocation des NPs de TiO_2 dans le blé

Nos premières recherches ont porté sur l'évaluation de la pénétration et de la phytotoxicité de NPs de TiO_2 sur le blé cultivé en hydroponie. Pour cette étude, nous avons choisi les NPs A12 et R20 qui sont les deux plus petites NPs de la gamme.

Leur pénétration a été étudiée par différentes techniques d'imagerie. Des cartographies par µ-XRF de coupes de racines ont mis en évidence une pénétration des deux types de NPs. Ces NPs sont adsorbées sur l'épiderme de la racine et migrent vers le parenchyme et le cylindre central. Ces constatations ont été confirmées par l'observation des racines en MEB et en MET. Les images MET permettent notamment d'identifier la répartition des NPs à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Les NPs ont ainsi été observées dans les espaces intercellulaires (parois) mais également dans les espaces intracellulaires (cytoplasme, vacuole) ce qui suggère que ces NPs sont transférées au cylindre central à la fois par la voie symplasmique et par la voie apoplasmique. Au niveau du cadre de Caspary, les NPs sont observées dans les parois épaissies de l'endoderme.

Les mêmes techniques ont été employées pour l'étude de la translocation des NPs vers les parties aériennes. Les cartographies en µ-XRF ont également démontré la présence de titane, dans de moindres proportions, dans les feuilles de blé. Les NPs sont accumulées dans les feuilles sans localisation préférentielle : les observations en MET ont révélé la présence des NPs à la fois dans les vaisseaux et dans le parenchyme. Dans les cellules, elles sont observées dans les vacuoles, le cytoplasme, le noyau et les chloroplastes.

Les cartographies par µ-XRF ont été réalisées sur des lignes de lumière synchrotron permettant en outre une caractérisation *in situ* du titane par XAS (lignes LUCIA à SOLEIL et ID21 à l'ESRF). Cette analyse complémentaire a permis de montrer que le titane était présent dans les végétaux sous forme de NPs et non sous forme d'ions dissous, aussi bien dans les racines que dans les feuilles.

Enfin, l'impact des NPs sur le développement et la physiologie du blé a été étudié à travers des critères tels que la germination, la longueur des racines, la biomasse sèche, l'ETP ou encore le

contenu en chlorophylle et l'apparition d'un stress oxydant. La présence de NPs dans le milieu de culture module uniquement la longueur des racines qui se trouve accrue lors d'expositions à des concentrations de 50 et 100 mg/L de NPs de TiO_2. Les autres indicateurs restent inchangés, soit parce qu'effectivement il n'y a pas de modulation soit car le stress occasionné par les NPs a déjà été réprimé.

Aucune différence liée à la phase cristalline des NPs n'a pu être mise en évidence lors de cette étude.

L'article relatant ces résultats est actuellement soumis au journal Nanotoxicology.

TiO_2 nanoparticle accumulation, translocation and impact in an edible plant: wheat

CAMILLE LARUE[1], JULIEN LAURETTE[1], NATHALIE HERLIN-BOIME[2], BARBARA FAYARD[3, 4], ANNE-MARIE FLANK[5], FRANÇOIS BRISSET[6], MARIE CARRIERE[1,7]

[1]UMR3299 CEA-CNRS, Service Interdisciplinaire des Systèmes Moléculaires et Matériaux, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. camille.larue@cea.fr; julien.laurette@cea.fr

[2]URA2453 CEA-CNRS, Service des Photons, Atomes et Molécules, Laboratoire Francis Perrin (LFP), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. nathalie.herlin@cea.fr

[3]UMR8502 CNRS-Université Paris Sud, Laboratoire de Physique des solides (LPS), Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France. fayard@lps.u-psud.fr

[4]European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), ID21 beamline, B.P. 220, 38043 Grenoble, France.

[5]SOLEIL, Saint Aubin, B.P. 48, 91192 Gif sur Yvette, France. anne-marie.flank@synchrotron-soleil.fr

[6]UMR8182 CNRS-Université Paris-Sud, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), 91405 Orsay, France. francois.brisset@u-psud.fr

[7]UMR E3 CEA-Université Joseph Fourrier, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN), 38054 Grenoble Cedex 9, France. marie.carriere@cea.fr

ABSTRACT

Intensive production of TiO_2 nanoparticles (TiO_2-NPs) would lead to their release in the environment. Their ecotoxicological impact is still poorly documented, while their use in commercial goods is constantly increasing. In this article, we report for the first time the comparative root uptake and transfer to leaves of TiO_2-NPs, anatase or rutile and bigger than root cell wall pores, in wheat grown in hydroponics. Using advanced techniques based on synchrotron radiations and transmission electron microscopy, our results provide evidence that small agglomerates of TiO_2-NPs distribute through whole plant tissues without dissolution or crystal phase modification during transfer. TiO_2-NP exposure leads to an increase in root length but has no impact on other physiological parameters. Consequently, by modifying wheat plant development, TiO_2-NPs would affect the equilibrium of the ecosystem. Moreover, they may be transferred to the food chain through accumulation in food crops.

KEYWORDS: Titanium dioxide nanoparticle, ecotoxicity, plant, wheat, X-ray fluorescence microscopy, X-ray absorption spectroscopy

RUNNING HEAD: TiO_2-NP uptake in wheat

Correspondance: Marie Carrière, new permanent address: CEA Grenoble, LAN, Bât C5, pce 632, 38054 Grenoble Cedex 9, France. +00 33 (0)4 38 78 03 28. marie.carriere@cea.fr

1. Introduction

Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) are presently among the most highly produced NPs in the world, and are included in the composition of a number of commercial goods: paint, concrete, sunscreens and drugs. This intensive production and the bad recycling of nanoproducts may lead to their release in the environment and potential interaction with plants. Recently published modeling data predict the presence of 136 mg TiO_2-NPs per kg of sewage sludge, leading to an annual accumulation of 89 µg TiO_2-NPs per kg of agriculture soils treated with this sludge (Gottschalk *et al.*, 2009). Plants possess thick, rigid and hydrophobic cell walls that may not allow NPs with diameters superior to several nanometers to be taken up by roots. Indeed, these cell walls are pierced with pores with diameters about 5 nm (Carpita *et al.*, 1979). Knowledge regarding the uptake and subsequent root-to-shoot translocation of NPs in plants is very scarce. Accumulation of NPs in vegetal tissues may pose sanitary problems, since it would represent a route of entry of NPs into the food chain.

In the literature relating NP uptake and translocation in plants, 20 nm ZnO-NPs have been shown to be taken up and exert deleterious effects on ryegrass (Lin and Xing, 2008). These effects are partly attributed to NP dissolution and subsequent release of toxic Zn^{2+} ions. Individual ZnO-NPs are observed in the cell walls and protoplastic compartments of root parenchyma and stele, however their upward translocation is very limited (Lin and Xing, 2008). Additionally, 20 nm Fe_3O_4-NPs are taken up by roots and translocated to the foliar tissue of pumpkins (Zhu *et al.*, 2008). Natural organic matter conjugated fullerene C_{70}-NPs (1.19 nm) are taken up by rice seeds during germination, translocated to the grown plantlets where they accumulate in most tissues including newly developed seeds (Lin *et al.*, 2009c). The germination of these seeds leads to the development of second generation plantlets where NPs are also detected in the leaves: this article demonstrates the uptake, translocation and generational transmission of insoluble carbon-based NPs. The field of NP impact on plants has recently been reviewed (Rico *et al.*, 2011). Briefly, NPs have been described as decreasing the germination rate, altering root growth, disturbing mitosis but also enhancing photosynthesis and nitrogen assimilation.

Regarding TiO_2-NPs, several studies describe their impact on plant development and physiological functions. However, the conclusions of these studies are often contradictory. For instance, exposure of maize roots to 30 nm TiO_2-NPs inhibits leaf growth and transpiration (Asli and Neumann, 2009). This may be due to the reduction of water availability in the plant caused by the physical hindrance of the apoplastic flow through root cell wall pores. Conversely, 25 nm and 100 nm TiO_2-NPs exert no effect on willow tree transpiration, growth or water use efficiency (Seeger *et al.*, 2009), certainly due to particle sedimentation during the exposure stage, which is amplified by exudation of organic substances from the roots. A series of articles describes a positive impact of 5 nm TiO_2-NPs on spinach seed germination and plantlet growth (Yang *et al.*, 2006). Several mechanisms are enlightened and among them promotion of photosynthesis, acceleration of nitrogen assimilation (Yang *et al.*, 2006) and reduction of the photosensitivity of chloroplasts (Hong *et al.*, 2005a). In none of these articles is TiO_2-NP accumulation in plants reported. Only very recently has the uptake and distribution of anatase TiO_2-NP (2.8 nm)-based nanoconjugates been reported in plantlets of *Arabidopsis thaliana* grown in hydroponics (Kurepa *et al.*, 2010). Due to their small size,

these NPs may be able to diffuse through the pores of plant cell walls. These NPs were found to alter the plant cytoskeleton (Wang *et al.*, 2011a). Moreover, a study on wheat grown in natural soil spiked with 20 nm TiO_2-NPs (crystalline phase not specified) shows a high level of NP adsorption on the root epidermis but no NP penetration into the roots is detectable (Du *et al.*, 2011). This exposure induced a decrease in biomass.

To the best of our knowledge, data on internalization and transfer of TiO_2-NPs bigger than root wall pore size are lacking.

The first objective of the present study was to elucidate NP penetration in plant roots and their possible subsequent transfer to shoots, and to check for any differential accumulation and translocation of anatase NPs as compared to rutile NPs. This study thus focuses on non surface-conjugated nanosized TiO_2, either anatase or rutile, with average diameters of 14 and 20 nm, respectively. Special attention was paid to NP physicochemical characterization. Wheat was chosen for its agronomic interest as it is the fourth-ranked culture in the world with 685 million tons produced last year (www.fao.org). NP accumulation and translocation were assessed using advanced techniques based on synchrotron radiations. Titanium repartition in plants was imaged by micro-X-ray fluorescence (SR-µXRF) and its speciation was obtained by X-ray absorption spectroscopy (XAS). In complement, scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) observations made it possible to precisely identify TiO_2-NP distribution in root and leaf ultrastructures. The second objective was to correlate NP accumulation with their phytotoxic impact. It was assessed through seed germination rate, root length, biomass and also photosynthetic pigment contents, thiobarbituric acid reactive species quantities (TBARS) and H_2O_2 production in leaves.

Altogether, these data give valuable information on plant responses to TiO_2-NP exposure.

2. Material and methods

2.1. Nanoparticle characterization and dispersion

TiO_2-NPs were synthesised by laser pyrolysis (Pignon *et al.*, 2008) and annealed at 400°C for 3 h under air to remove free carbon impurities. To confront accumulation and phytotoxicity results with NP characteristics, a set of techniques was used to precisely characterize our material. Their diameter and morphology were determined by direct TEM observations (Philips EM 208). Their crystalline shape was determined by X-Ray Diffraction (XRD) on 1 g of nanopowder. Their specific surface area (ssa) was analysed according to the Brunnauer, Emmet and Teller method (Brunauer *et al.*, 1938). For plant root exposure, concentrated suspensions of NPs (10 g/L) were prepared in ultrapure sterile water (pH 5.5) dispersed by pulsed sonication (Autotune 750W, Bioblock Scientific) at 4°C for 30 min, as previously described (Simon-Deckers *et al.*, 2009). We chose to avoid the addition of a dispersing agent that could possibly modify the NP surface and properties. These concentrated suspensions were then diluted in ultrapure water for plant exposure, to a final concentration of 100 mg/L. The agglomeration state of these 100 mg/L NP suspensions was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern ZetaSizer (3000HS, Worcestershire, UK). Simultaneously, the zeta potential (ζ) was recorded as a measurement of the NP surface charge. Due to the photoreactivity of TiO_2-NPs, root exposure was performed in the dark.

2.2. Plant culture and exposure

Seeds of wheat (*Triticum aestivum*, Courtaud) were obtained from AgriObtention (Guyancourt, France) and sterilized using $Ca(ClO)_2$ (1%). Seeds were germinated for 15 days on sand soaked with Hoagland solution (0.5 mM $MgSO_4$, 2.5 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.5 mM KH_2PO_4, 2.5 mM KCl, 25µM H_3BO_3, 5µM $MnSO_4$, 0.4 µM $ZnSO_4$, 0.2 µM $CuSO_4$, 0.25 µM Na_2MoO_4, 4 µM Fe-Na-EDTA, pH 5.5). After the germination stage (15 days), each plantlet was carefully transferred to an individual tube containing TiO_2-NP (100 mg/L) (Figure 1). This procedure was set up to avoid any possible accidental leaf contamination by the TiO_2-NP suspension.

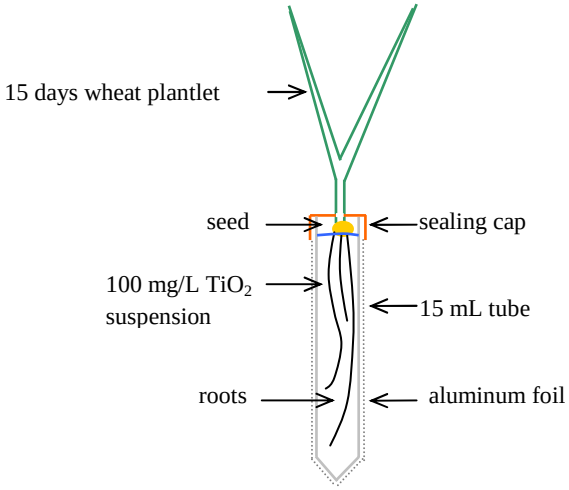


Figure 1. Experimental setup for hydroponic root exposure. This system protects roots from light and avoids any leaf contamination upon root exposure to TiO_2-NP suspensions.

We took great care not to touch the plant roots during transfer, and we chose not to agitate the exposure medium to prevent root damage that can permit free entrance of NPs into roots. Plants were exposed to TiO_2-NPs for 7 days for accumulation and translocation experiments, as well as to investigate NP impact on plant development. We measured TBARS and H_2O_2 content at earlier time points, with the endpoint exposure limited to 24 h. The tubes were covered with aluminium foil to protect the roots from light. All experiments were carried out in a growth chamber under controlled conditions: day/night photoperiod (16/8 h), day/night temperature (24/20 ± 1 °C) and day/night relative humidity (70/75 %).

2.3. Analysis and microscopy techniques

For SR-µXRF and SEM analysis, pieces (2 cm long) of plant roots and leaves were carefully washed with deionised water, cryofixed by immersion in isopentane chilled with liquid nitrogen (-160 °C) and immediately embedded in Tissue Tek OCT™ resin (Agar Scientific, Essex, UK). Fifty µm cross sections were cut using a cryomicrotome (Leica Ultracut 5, France), then freeze-dried at -10°C for 48 h under a vacuum of 0.37 mbar. The distribution of titanium (Ti) and potassium (K) in plant thin sections were mapped by SR-µXRF. The spot size was 5 × 5 µm² on LUCIA beamline (SOLEIL) and 1 × 1 µm² on ID21 beamline (ESRF). Data were processed using PyMCA software (Sole *et al.*, 2007). XAS spectra were recorded between 4.95 and 5.05 keV, i.e. around Ti X ray absorption edge (4.966 KeV)

in order to determine Ti speciation in a spatially resolved manner. Spectra were collected in situ on SR-µXRF map locations containing high concentrations of Ti. On each sample, at least 10 spectra were recorded with an energy resolution of 0.5 eV. XAS spectra were also collected for Ti standards: 12 nm, 25 nm and 140 nm anatase TiO_2-NPs, 20 and 50 nm rutile TiO_2-NPs, pressed as pellets. For SEM analysis, samples were carbon-coated and imaged on a Zeiss-Supra 55VP Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) equipped with an X-ray Energy Dispersive Spectrometer (EDS) operated at 15 kV. Images were recorded in secondary electron and backscattered electron modes. For TEM observations, fractions of wheat roots and leaves (5 mm long) were fixed at room temperature in a mixture of 3% (vol./vol.) glutaraldehyde and 1% (vol./vol.) paraformaldehyde prepared in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), then post-fixed in 2% (vol./vol.) OsO_4 and finally dehydrated in graded concentrations of ethanol to be embedded in Spurrs' resin. Ultrathin sections (70 nm) were prepared, deposited on coated copper grids (Agar Scientific) and observed on a Philips EM 208 TEM operated at 80 kV.

Throughout the process, great care was taken in manipulating and cutting samples while avoiding contamination of plant sections with NPs: controls were cut first, then leaves where we were sure that there were no NPs at the surface and finally roots. Between each cutting, the razor blade was changed or the diamond knife was carefully cleaned. We can thus ensure that controls and leaves were free from NP contamination.

2.4. Phytotoxicity assessment

For assessments of NP impact on plant development, wheat seeds were germinated in Petri dishes in ultrapure water (control) or 10, 50 or 100 mg/L of TiO_2-NP suspension, either anatase or rutile. After 7 days, germinated seeds were counted according to the US-EPA guidelines (US-EPA, 1996) and a picture was taken to evaluate root length using Image J software. 5 plantlets per condition were then transferred into individual tubes to continue their growth in Hoagland solution for 7 days. At the end of the period, the plantlets were dried at 65°C for 48 h and their dry biomass was recorded.

Photosynthetic pigments were extracted by grounding 100 mg of fresh leaves in 30 mL of 80% acetone, and further macerated in this solvent for 24 h at 4°C. Pigment content was evaluated by measuring absorption at 470, 645 and 663 nm (Moran, 1982).

TBARS and H_2O_2 extraction were achieved by grounding 100 mg of fresh leaves in 7 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). TBARS content was evaluated by spectrophotometry at 532 nm and 600 nm after 30 min reaction at 95°C with a mixture of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% TCA. H_2O_2 was assessed by adding 0.5 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 6.8) and 2 mL of KI (1M) to 0.5 mL of the extract. After 1 h in the dark, absorbance was read at 390 nm (Wang *et al.*, 2008b).

2.5. Statistical analysis

All experiments were composed of at least 3 replicates (up to five) and were reproduced independently three times. Significant difference was determined by the non parametric test of Kruskall-Wallis with $p<0.05$.

3. Results

3.1. Nanoparticle characterization

The NPs used were 95% anatase and 100% rutile. They were round-shaped, with a mean primary diameter of 14 nm and 20 nm, as measured by TEM (Figure 2A-B). Their specific surface areas (ssa), measured according to the BET protocol (Brunauer *et al.*, 1938) were 82 $m^2.g^{-1}$ and 73 $m^2.g^{-1}$, respectively.

For plant exposure, TiO_2-NPs were diluted in ultrapure water. After dilution TiO_2-NPs were loosely agglomerated and formed clusters of 150-300 nm (Figure 2C). Less than 10% (in number) of rutile NPs were agglomerated as larger clusters, for which the zetasizer gives a measure at 1000 nm or more. Due to the linearity of this equipment, this measurement can only be taken as an approximation, which means that these agglomerates could be much larger. The zeta potentials of NPs, representing their surface charge, was negative in water for both anatase and rutile NPs, with -11 and -38 mV values, respectively.

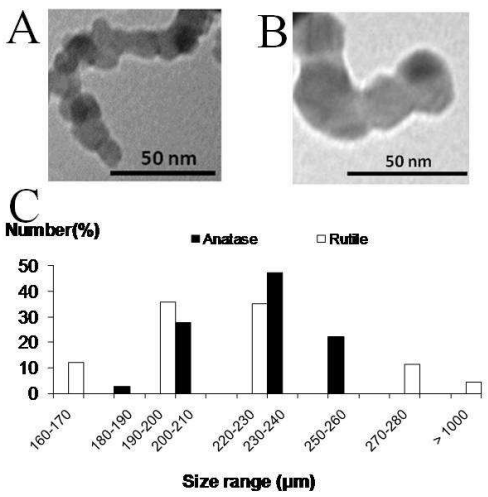


Figure 2. Characterization of TiO_2-NPs. TiO_2-NP size and shape were deduced from transmission electron microscope images of anatase (A) and rutile (B) TiO_2-NPs. Agglomeration state (C) was evaluated after 30 min of pulsed sonication on 100 mg/L TiO_2-NP suspension in water.

3.2. Nanoparticle internalization in roots

After a 7-day root exposure to 100 $mg.L^{-1}$ of anatase TiO_2-NPs, Ti distribution was mapped in wheat root cross sections by SR-µXRF. In this technique each fluorescence peak, according to its energy, can be attributed to one element. From fluorescence spectra, elemental maps are deduced. Since potassium (K) is an endogenous element of plants, its distribution makes it possible to delimit the root section (Figure 3, green). Ti distribution maps were superimposed on these images (Figure 3, red). The analyzed areas were chosen so that they covered the root epidermis, parenchyma and tubular vascular bundles. On control plants, no Ti was detected in SR-µXRF images (Figure 3A), and the Ti peak (4.508 keV on the fluorescence spectrum) was absent (Figure 3B). Conversely, in TiO_2-NP exposed roots, elemental images contained Ti-rich clusters (Figure 3C-3D), and the Ti peak was clearly defined in the fluorescence spectrum (Figure 3E).In these plant samples, Ti was strongly

adsorbed onto the plant root epidermis, but also internalized into the root: Ti-rich clusters were observed in root cortical parenchyma (Figure 3C, arrows) and in the vascular cylinder (Figure 3D, arrows). This distribution was observed both on root sections of plants exposed to anatase and to rutile NPs (not shown).

In order to prove that the Ti-rich clusters observed in plant roots were anatase and rutile TiO_2-NPs and not dissolved ions, and to identify any modification in their physico-chemistry which would be caused by their transfer in plant tissues, Ti-rich areas were analyzed by XAS performed *in situ* immediately after SR-µXRF image acquisition (Figure 3F-3G). The overall shapes of XAS spectra of anatase and rutile TiO_2-NPs differ, and each crystal phase can thus be identified (Figure 3F). Moreover, as described elsewhere (Luca *et al.*, 1998), the pre-edge structure at the Ti K-edge features three peaks, A1, A2 and A3 (Figure 3G). The relative intensity and the location of these peaks are specific of TiO_2 crystal phase and particle diameter. Typically, the intensity of the A2 peak increases when the NP diameter decreases, indicating the distortion of the Ti-O_6 octahedral unit. Meanwhile, the intensity of the A1 peak decreases when the TiO_2-NP diameter decreases (Chen *et al.*, 1997). The pre-edge structure and the overall shape of the spectra recorded in the Ti hot spots observed in plant roots exposed to anatase or rutile TiO_2-NPs confirm i) that they contain TiO_2 nanoscaled particles, ii) that these NPs are in the same initial crystal phase as those of the exposure medium. The relative intensity of the A1 and A2 peaks in the pre-edge structure of XAS spectra recorded locally in plant roots did not differ from those of the TiO_2-NP reference (Figure 3G), confirming that the TiO_2-NP diameter was not reduced as a consequence of plant uptake. We thus conclude that TiO_2-NPs did not partially dissolve when accumulated in plant roots.

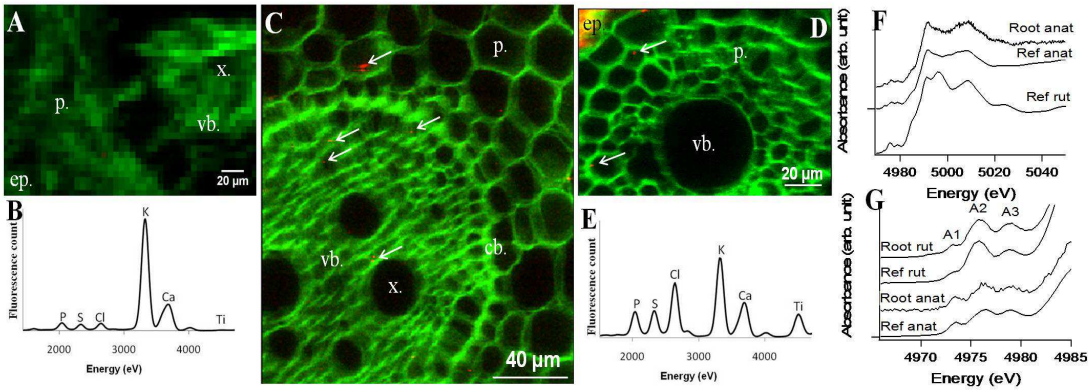


Figure 3. SR-µXRF analysis of TiO_2-NP uptake in plant roots. Roots were grown in water (A-B) or exposed to 100 mg/L anatase TiO_2-NP suspensions (C-E). Cross sections were analyzed by SR-µXRF (B, E: fluorescence spectra; A, C, D: fluorescence maps of K (green) and Ti (red), Ti hot spots are identified by arrows). Image A was acquired on LUCIA beamline (resolution: 5 µm²); B and C were acquired on ID21 beamline (resolution: 1 µm²). XAS spectra of Ti-enriched zones: whole spectra (F) and enlargement on the pre-edge feature (G) recorded on reference anatase and rutile nanopowders (Ref anat and Ref rut), or on root cross-sections of plants exposed to anatase or rutile NPs (Root anat and Root rut).

In order to gain initial views of the precise distribution of Ti and of the mechanisms governing TiO_2-NP uptake by plants (apoplastic *vs.* symplastic transport), thin sections of wheat roots were observed by electron microscopy. SEM observations of root sections exposed to anatase TiO_2-NPs showed clusters of 100-1000 nm containing a heavy element since these clusters are highly brilliant when using the backscattered energy mode. These clusters were either adsorbed on the walls of

cortical parenchymal cells (Figure 4A, 4B) or localized on the root epidermis (Figure 4C, 4D). Their energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis confirmed that they contained Ti (Figure 4E). Moreover, TEM observations of root sections exposed to anatase or rutile TiO_2-NPs showed either anatase (Figure 4F-I) or rutile (Figure 4J) NPs in all root cell compartments. They were observed in cell walls (Figure 4H, 4J) and even in the Casparian band (Figure 4H) as well as inside cells on both sides of the Casparian band (in parenchyma and in endodermal cells or in vascular bundle cells). They were either entrapped in membranous structures (Figure 4F, 4G) which looked like endosomes or were free in vacuoles (Figure 4I) or in the nucleus (Figure 4J). These black agglomerates could not be seen in root sections of the control plants (Figure 4K).

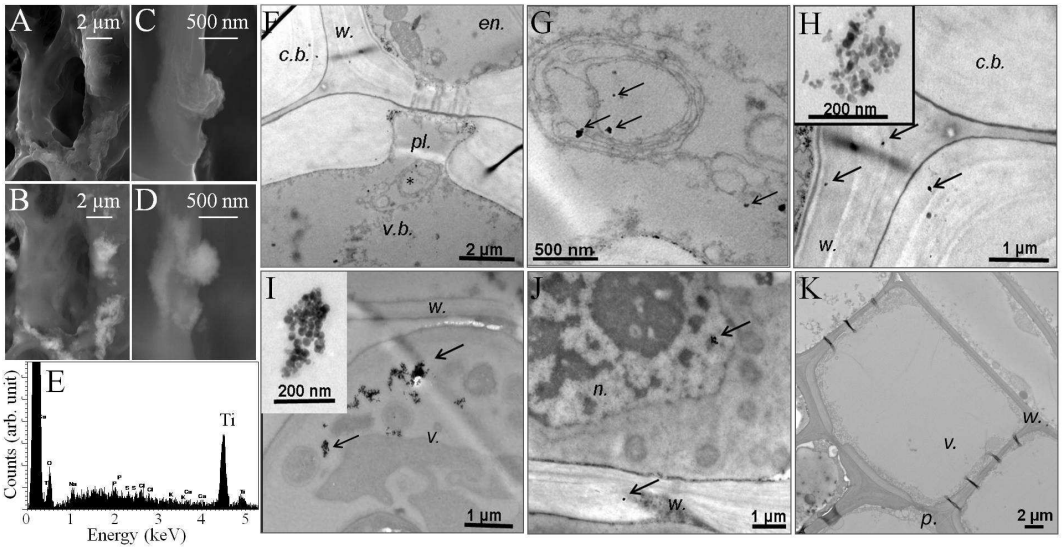


Figure 4. EM observations of TiO_2-NP distribution in plant roots. Roots were grown in water (K) or exposed to 100 mg/L anatase (A-D, F-I) or rutile (J) TiO_2-NP suspensions. Thin sections were analyzed either by scanning electron microscopy (SEM, A-D) coupled to energy dispersive spectroscopy (EDS, E) or by transmission electron microscopy (TEM, F-K). Sections were observed in the parenchyma (A, B) or in the epidermis (C, D). SEM images were acquired in secondary electron (A, C) or in backscattered electron (B, D) modes, the latter enabling enhancement of the signal of heavy elements such as Ti. Ultrathin sections were observed by TEM showing the Casparian band (*c.b.*) with a plasmodesma (*pl.*), and the adjacent endodermal (*en.*) and vascular bundle (*v.b.*) cells. NPs (identified by arrows) are seen entrapped in membranous structures (G is a zoom of the area marked by a star on F), in cell walls (*w.* in H, J), in vacuoles (*v.* in I) or even in the nucleus (*n.* in J).

In conclusion, both anatase and rutile TiO_2-NPs can penetrate wheat roots. Since TiO_2-NPs were observed in the vascular cylinder of roots, they may be translocated to the shoot: once inside root vascular vessels, NPs might follow the water flow, driven by plant transpiration.

3.3. Nanoparticle transfer to leaves

To confirm this hypothesis, Ti distribution was also mapped by SR-µXRF on wheat plant leaf sections. No Ti-rich region was observed on leaf sections of control plants (Figure 5A). When plant roots had been exposed to anatase TiO_2-NPs, Ti-enriched zones were observed in leaf parenchyma and veins (Figure 5B). The observation of leaf thin sections from plants exposed to rutile TiO_2-NPs (Figure 5C) led to the same conclusions: Ti-enriched regions were visible in leaf parenchyma and veins. XAS analysis of Ti-rich clusters in plant leaves (Figure 5D) led to the conclusion that the Ti-rich

clusters were TiO_2-NPs, and their diameter and crystal phase were not modified during root-to-shoot translocation.

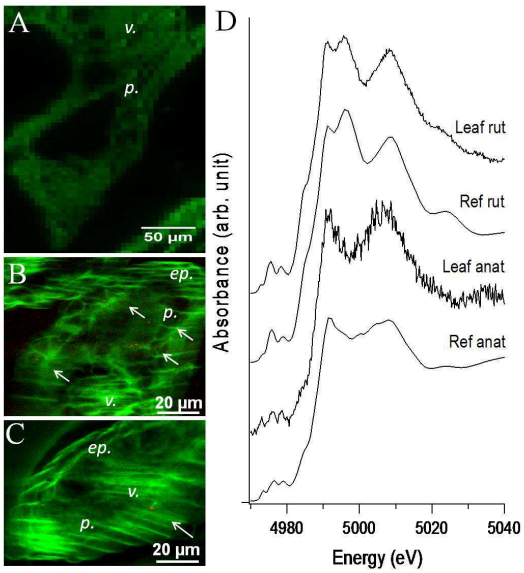


Figure 5. SR-µXRF analysis of TiO_2-NP distribution in plant leaves. Plant roots were grown in water (A) or exposed to 100 mg/L anatase (B) or rutile (C) TiO_2-NPs dispersed in water. Cross sections of their leaves were analyzed by SR-µXRF (fluorescence maps of K in green and Ti in red, Ti hot spots identified by arrows) encompassing leaf parenchyma (*p.*), veins (*v.*) and epidermis (*ep.*). A was acquired on LUCIA beamline (resolution: 5 µm²); B and C were acquired on ID21 (resolution: 1 µm²). XAS spectra of reference anatase and rutile nanopowders (Ref anat and Ref rut) or Ti-enriched regions in cross sections of leaves sampled on plants exposed to anatase or rutile NPs (Leaf anat and Leaf rut).

As in the root samples, TEM observations were conducted in order to check NP distribution at the cell scale. No NP was observed in the leaves of control plants (Figure 6A), whereas NPs were observed in all the compartments of anatase and rutile-exposed leaf cells (Figure 6B-F).

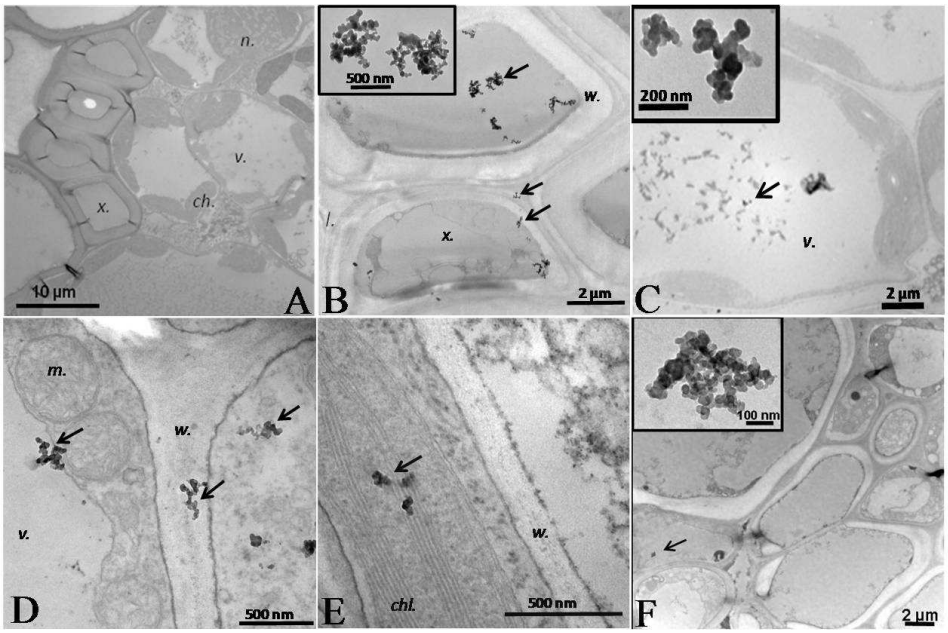


Figure 6. TEM observations of TiO_2-NP distribution in plant leaves. Plant roots were grown in water (A) or exposed to 100 mg/L anatase (B-E) or rutile (F) TiO_2-NPs. NPs were found in the xylem (*x.* in B), in cell walls (*w.* in B and D), and but also in parenchymal cells in vacuoles (*v.* in C, D and F) or in organelles such as chloroplasts (*chl.* in E).

Agglomerates of NPs were observed in vascular vessels (Figure 6B), in vacuoles (Figure 6C) and in the walls of parenchymal leaf cells (Figure 6D). They were also observed inside leaf cells, where they localized in vacuoles (Figure 6D, 6F) and chloroplasts (Figure 6E).

3.4. Nanoparticle impact on plant development and physiology

Since TiO_2-NPs are internalized in plant tissues, their potential impact on plant development and physiology was investigated. Indeed, root length was increased by more than 50% when seeds were germinated in suspensions containing 50 and 100 mg/L of anatase or rutile NPs (Figure 7A). Inversely, no significant impact can be seen on the seed germination rate with a mean germination of 70% (Figure 7B) and a mean dry biomass of 32 mg (Figure 7C). As markers of oxidative stress, TBARS content together with H_2O_2 production were slightly increased in the leaves of plants exposed to NPs (Figure 7C, 7D), but this trend was not statistically significant.

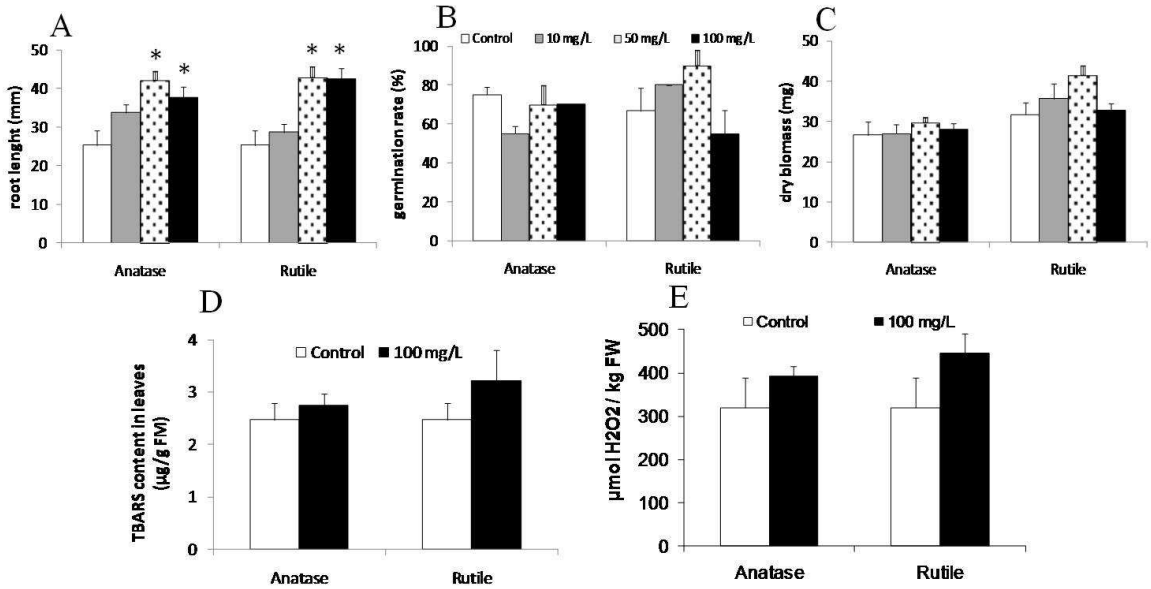


Figure 7. Impact of TiO_2-NP exposure on wheat development and physiology. Seeds were exposed to 0, 10, 50 or 100 mg/L of anatase or rutile TiO_2-NP suspensions. Root lenght (A) and germination rate (B) were recorded after a 7-day exposure. Dry biomass (C) was evaluated after a 15-day growth (7-day exposure). Thiobarbituric acid reactive species (TBARS, D) and H_2O_2 content (E) in leaves were evaluated after a 24-h exposure to 100 mg/L NPs. *p<0.05 versus control (unexposed plants).

Finally, chlorophyll A, chlorophyll B and carotenoid contents were not modulated by NP exposure with a total photosynthetic pigment content of about 1.6 mg/g fresh matter and a ratio chl A/chl B of 5 (Table I).

Table I. Photosynthetic pigment content after exposure to TiO_2-NPs[a]

	chl. A	chl. B	carotenoid	chl. total
Control	1.027 ± 0.08	0.201 ± 0.01	0.381 ± 0.02	1.609 ± 0.11
Anatase	0.995 ± 0.09	0.189 ± 0.01	0.371 ± 0.03	1.556 ± 0.13
Rutile	1.084 ± 0.02	0.210 ± 0.02	0.402 ± 0.01	1.695 ± 0.05

[a]Wheat plantlets were exposed to 100 mg/L of anatase or rutile TiO_2-NPs for 7 days. Chlorophyll A (chl. A), chlorophyll B (chl. B) and carotenoid contents in leaves were measured by spectrophotometry. Data given are means of 3 plantlets in mg/g FM ± standard deviation.

4. Discussion

In this article, we prove that bare, anatase and rutile TiO_2-NPs adsorb on the epidermis of wheat roots, where they accumulate and are radially transferred to vascular vessels. In plant roots, water and nutrients are transferred from the epidermis to the vascular cylinder by two routes: the apoplasm and the symplasm. Apoplastic transfer occurs in the extracellular compartment, where solutes and materials passively diffuse. The symplasm is constituted by intracellular spaces, and molecules are transferred from one cell to another through plasmodesmata. In the central part of the root lies the stele, enclosing the vascular vessels. The Casparian band blocks the apoplastic flow of materials and solutes from the cortical parenchyma to the stele, forcing them to pass from apoplasm to symplasm. TiO_2-NP distribution observed in this study clearly shows that radial transfer of TiO_2-NPs through plant roots follows both the apoplastic and the symplastic routes. TiO_2-NPs are directly transferred through the Casparian band since we observed them in this compartment. They may also transit through plasmodesmata to finally reach the vascular vessels since we observed them inside the cells. These pathways have also been hypothesized in others articles (Lin and Xing, 2008; Chen *et al.*, 2010b). We show that once inside the vascular vessels, TiO_2-NPs are translocated from the roots to the shoots: they may follow the water flow, driven by plant transpiration as already suggested for carbon NPs (Lin *et al.*, 2009c). Having reached leaf veins, TiO_2-NPs might diffuse from vascular vessels to leaf parenchyma. The NPs we used are of diameters exceeding plant wall pore diameters and we observed them in the cell walls of roots, in leaves and in the Casparian band. Our hypothesis is that they may create new pores in cell walls, or enlarge the existing pores, and that they may damage cell membranes, via oxidative stress. TiO_2-NPs have been described as inducing the production of oxygenated free radicals at their vicinity, when illuminated by UV light but also in the dark, by reaction with water and dissolved oxygen (Fenoglio *et al.*, 2009). This property is common between anatase and rutile TiO_2-NPs, although the nature of the free radicals produced differs (Fenoglio *et al.*, 2009). These free radicals can initiate typical chain reactions in plant cells, and especially in cell walls, which can render them porous. These lesions would then increase plant epidermis permeability, and consequently lead to NP internalization in roots. It can also explain how TiO_2-NPs with diameters above plant cell wall permeability limits (i.e. 3-5 nm, (Carpita *et al.*, 1979) reach the vascular bundle. This hypothesis is sustained by the increase of H_2O_2 and TBARS that we observe in plants exposed to NPs. TBARS reveals, in particular, the presence of malondialdehyde (MDA) which is a by-product of membrane oxidative degradation. This result confirms what has previously been described by others (Ghosh *et al.*, 2010): MDA content increases in *Allium cepa* roots exposed to 320 mg/L of 100 nm TiO_2-NPs for 24 h. To summarize, TiO_2-NPs would locally create oxidative stress that generates ROS such as H_2O_2 that in turn alters cell walls and membranes giving NPs access to the plant tissue. These alterations can also explain their presence in all plant ultrastructures from the nucleus to the vacuole and other organelles.

NP may also enter cells by endocytosis. This hypothesis is supported by the observation of NPs entrapped in vesicles resembling endosomes on TEM pictures of root cells. Both ROS-mediated

penetration and endocytosis can take place simultaneously in plants, and would trigger NP transfer from exposure medium to plant roots, inside roots to the stele, and from roots to shoots.

By XAS analysis performed in situ on plant roots and leaves, we prove that the Ti-rich clusters observed by SR-µXRF are clusters of TiO_2-NPs, and not Ti ions resulting from TiO_2 dissolution, as occurs with ZnO-NPs (Lin and Xing, 2008) and with Ag-NPs (Yin *et al.*, 2011). The overall shapes of XAS spectra provide evidence that throughout the stages of plant transfer, TiO_2-NP physico-chemistry remains unmodified: their crystal phase does not change, and NPs do not dissolve. This absence of modification of physicochemical characteristics upon plant transfer has already been described for cerium oxide NPs (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b). Indeed, XAS analysis shows that nanoceria is taken up in hydroponics by alfalfa, corn, cucumber and tomato without any change in their crystalline structure (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b).

We demonstrate here that exposure of seeds and plantlets to TiO_2-NPs, either anatase or rutile, induces increased root elongation, but does not modulate the seed germination rate, plant dry biomass, or chlorophyll and carotenoid contents. Nor does it modulate plant evapotranspiration (not shown). As regards NP impact on plant development, various data are available in the literature, but few on TiO_2-NPs. A 72-h exposure to 1 g/L TiO_2-NPs with 15 nm diameter does not induce any modification of root elongation in *Allium cepa* (Klancnik *et al.*, 2011), whereas Ghosh et al. (Ghosh *et al.*, 2010) notice a decrease in *Allium cepa* root length after a 24-h exposure to 100 nm TiO_2-NPs. In the first study, NPs suspensions were prepared by vigorous shaking and were not sonicated. The authors mention that the average hydrodynamic diameter of NPs was 870 nm, meaning that the NPs were agglomerated. In the second study, NP suspensions were prepared by sonication and vortexing, but the authors give no information on the sonication mode (high energy sonication using an ultrasonic probe or a cuphorn device *vs.* ultrasonic bath, known to be much less efficient for dispersing NP agglomerates) and the agglomeration state of the resulting NP suspension. The discrepancy between our results and the results described in these two studies may come from the agglomeration state of NPs during plant exposure. Since the NPs we used were only loosely agglomerated, they may have caused drastically different effects on plant development. Decreased seed germination is demonstrated in several seed species exposed to 10 nm TiO_2-NPs but this effect is attributed to the stabilizer rather than to NPs (Garcia *et al.*, 2011). We did not use any potentially germination-hindering stabilizer, which may explain that we do not observe any impact of NPs on seed germination. Literature related to the impact of other NPs on plant development also gives contradictory results. For instance, the length of wheat roots exposed to Cu-NPs was reduced from 52 mm to 13 mm when plants were exposed to 1000 mg/L of NPs, and these NPs were observed inside root cells (Lee *et al.*, 2008). Similarly, wheat roots exposed to 2000 mg/L of La_2O_3-NPs, Gd_2O_3-NPs and Yb_2O_3-NPs showed a substantial decrease in length when CeO_2-NPs exposure had no impact (Ma *et al.*, 2010b). Finally, seed germination and root elongation were evaluated on 6 plant species (radish, rape, rye-grass, lettuce, corn and cucumber) exposed to 5 types of NPs (multi-walled carbon nanotubes, aluminium, alumina, zinc and zinc oxide). Results showed that the germination rate was not affected whereas root length was either increased (radish and rape exposed to aluminium or ryegrass exposed to multi-walled carbon nanotubes) or decreased (all plants exposed to Zn and ZnO) (Lin and Xing, 2007). Concerning NP impact on plant physiology, an increased photosynthesis process was displayed in spinach exposed to TiO_2-NPs (Hong *et al.*, 2005a; Zheng *et al.*, 2005). However, in these articles very few physicochemical characterizations of NP suspensions are provided. Chlorophyll content was also increased in mesquite exposed to citrate-coated $Ni(OH)_2$-NPs (Parsons

et al., 2010). Inversely, corn exposed to Fe_2O_3-NPs showed a decrease in both chlorophyll A and B (Racuciu and Creanga, 2007b). All these results taken together indicate that phytotoxicity of NPs varies according to plant species, NP type and suspension preparation procedures. This shows that no general trend of NP impact on plant development and physiology appears, and that the impact depends on the composition of NPs as well as on their agglomeration status. Interestingly, we show here that it does not depend on the TiO_2-NP crystalline phase, since the same modulations are observed when seeds and plantlets are exposed to anatase and rutile NPs.

5. Conclusion

The results presented here show that bare, 14-20 nm TiO_2-NPs, anatase and rutile, with diameters exceeding root plant cell wall permeability limits, are taken up and translocated in plant tissues, in an agriculturally-relevant plant model: wheat. NPs do not dissolve and their crystal phase does not change during plant transfer. Exposure to these TiO_2-NPs alters root elongation but not seed germination, plant dry biomass or photosynthetic pigment content. It causes a moderate oxidative stress, which may facilitate accumulation of NPs by damaging cell walls and membranes. Note that we examined plant response caused by very high concentrations of NPs, which are not representative of what would occur in a contaminated environment. This preliminary study was necessary to determine the potential responses of plants to TiO_2-NP exposure. More environmentally-relevant experiments need now to be carried out, which would make it possible to predict the potential ecosystem impact of NP exposure.

ACKNOWLEDGMENT: This work was funded by the region Ile de France through the framework C'nano Ile de France. C. Larue was supported by a fellowship from the ADEME and CEA, and this work was performed within the framework of the iCEINT research consortium. The authors would like to thank the European Synchrotron Radiation Facility and SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities at ID21 and LUCIA, and D. Jaillard from the Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay (CCME) for helping in ultramicrotomy and transmission electron microscopy. Authors also thank Donald White for the proofreading of the English.

2. Influence du diamètre des NPs de TiO_2 sur leur accumulation et leur phytotoxicité sur le blé

Après avoir démontré que les NPs de TiO_2 de diamètre inférieur ou égal à 20 nm pouvaient s'accumuler dans les racines de blé et être transférées vers les parties aériennes, des NPs de diamètre 25 à 700 nm ont été testées dans le but d'identifier une valeur seuil de diamètre à partir de laquelle les NPs de TiO_2 ne sont plus accumulées dans les plantes. En parallèle, nous avons évalué les effets phytotoxiques de ces particules sur le blé.

2.1. Pénétration racinaire du titane chez le blé cultivé en hydroponie

2.1.1. Quantification du titane dans les racines de blé

L'accumulation de titane dans les racines a été observée et quantifiée par µ-PIXE/RBS. Cette technique permet une analyse locale, effectuée sur des coupes transversales de racines. Elle présente, de ce fait, l'avantage de permettre la quantification du titane effectivement accumulé dans les racines, en s'affranchissant du titane adsorbé sur l'épiderme des racines (Figure 79A). Elle permet également de différencier le titane accumulé dans le parenchyme ou dans le cylindre central. Ainsi, des données quantitatives ont été obtenues pour toutes les tailles de particules de TiO_2 : de 12 à 700 nm (Figure 79B).

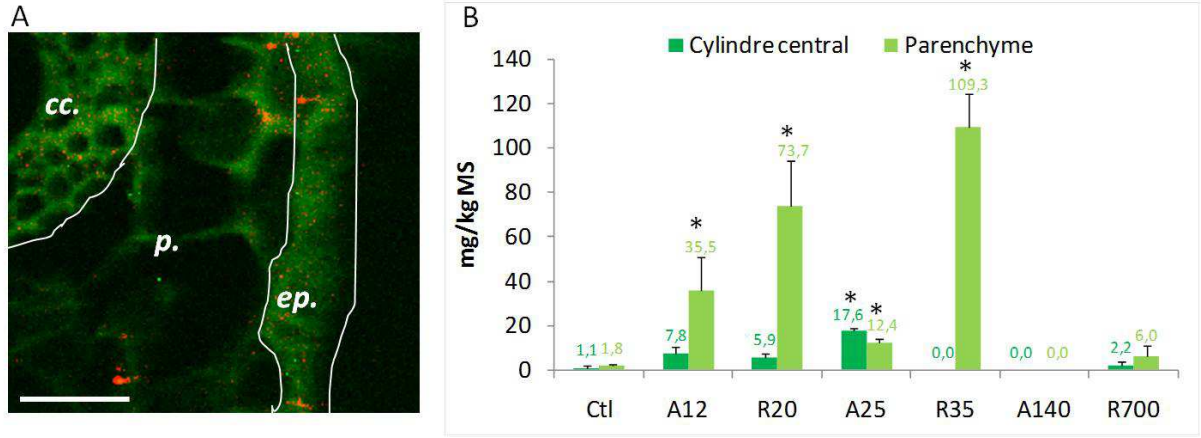


Figure 79 : A. Délimitation des zones de la racine pour la quantification (*cc. cylindre central, p. parenchyme, ep. épiderme*, barre d'échelle 50 µm). En vert, la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge, la cartographie de la répartition du titane. B. Quantification du titane dans le cylindre central et dans le parenchyme de racines exposées en hydroponie à 100 mg/L de différentes suspensions de particules TiO_2. *(* p≤0,05 entre Ctl et NPs)*

La quantité de titane accumulée dans le parenchyme des racines après une exposition de 7 jours à 100 mg/L de NPs varie de 12,4 mg Ti/kg de matière sèche (MS) pour A25 à 109,3 mg Ti/kg MS pour R35. La quantité de titane internalisée dans les racines de blé lors d'expositions à des microparticules de TiO_2 (A140 et R700) est négligeable ou nulle.

D'autre part, pour la majorité des NPs testées, le titane est accumulé en plus grande quantité dans le parenchyme de la racine que dans le cylindre central. Seule la NP A25 est davantage accumulée dans le cylindre central que dans le parenchyme. Cette différence pourrait provenir d'un

comportement des NPs en suspension différent. Ainsi, plus les NPs sont agglomérées (diamètre hydrodynamique important) plus leur passage jusqu'au cylindre central est ralenti et donc plus elles s'accumulent dans le parenchyme de la racine plutôt que dans le cylindre central. On dose 17,6 mg Ti/kg MS dans le cylindre central des racines exposées à A25 contre 4,5 mg Ti/kg MS en moyenne dans les racines exposées aux trois autres NPs. En détail, les NPs A12 et R20 forment des agglomérats d'environ 200 nm et la concentration en titane dans les racines exposées à ces deux NPs est de 7,8 et 5,9 mg Ti/kg MS (cylindre central), respectivement. La NP R35 forme des agglomérats sub-microniques en suspension et la teneur en Ti dans le cylindre central des racines exposées est nulle.

Enfin, une tendance semble se dégager pour une accumulation de titane plus importante dans les racines lors d'expositions aux NPs de phase cristalline rutile. Néanmoins, les différences de comportement des NPs selon leur degré d'agglomération (stockage dans les racines ou transfert vers les parties aériennes) ne nous permet pas de conclure.

2.1.2. Distribution du titane dans les racines de blé

Des plantules de blé de 15 jours, préalablement germées sur sable, ont été exposées en hydroponie pendant une semaine à des suspensions de particules de TiO_2 à 100 mg/L. A la fin de l'exposition, les racines ont été rincées à l'eau distillée puis des coupes transversales ont été préparées pour être analysées en µ-XRF (Figure 80; Figure 81). Une racine de blé non exposée, incubée une semaine dans de l'eau ultrapure, a également été analysée (Figure 80A).

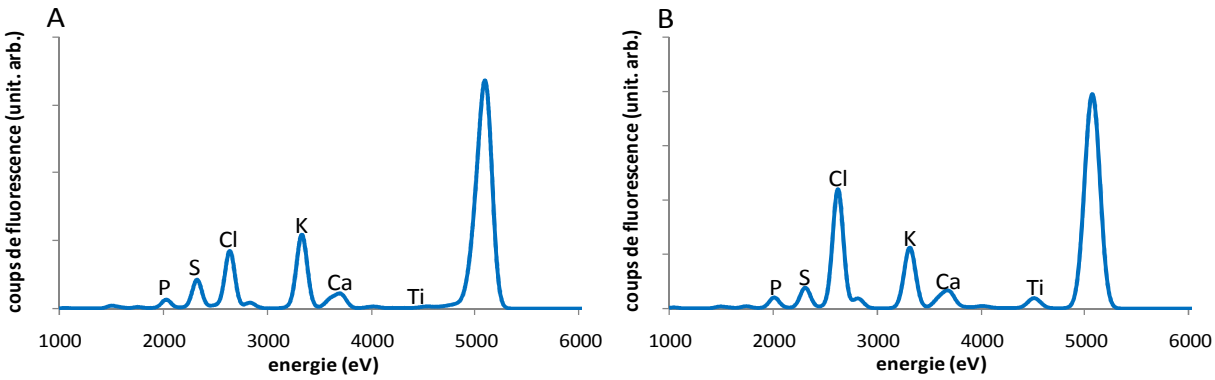


Figure 80 : Spectres XRF de coupes de racine de blé cultivé dans de l'eau ultrapure (A) ou exposé à 100 mg/L de NPs de TiO_2 A25 (B).

Ces deux spectres sont représentatifs de la teneur de chaque élément dans les racines analysées. C'est donc à partir de tels spectres que sont recréées les images en niveaux d'intensité présentées ci-après. Sur le spectre de la racine exposée aux NPs A25, on voit clairement apparaitre le pic du titane à une énergie de 4500 eV (Figure 80B). Ce pic est absent du spectre de la racine non exposée (Figure 80A).

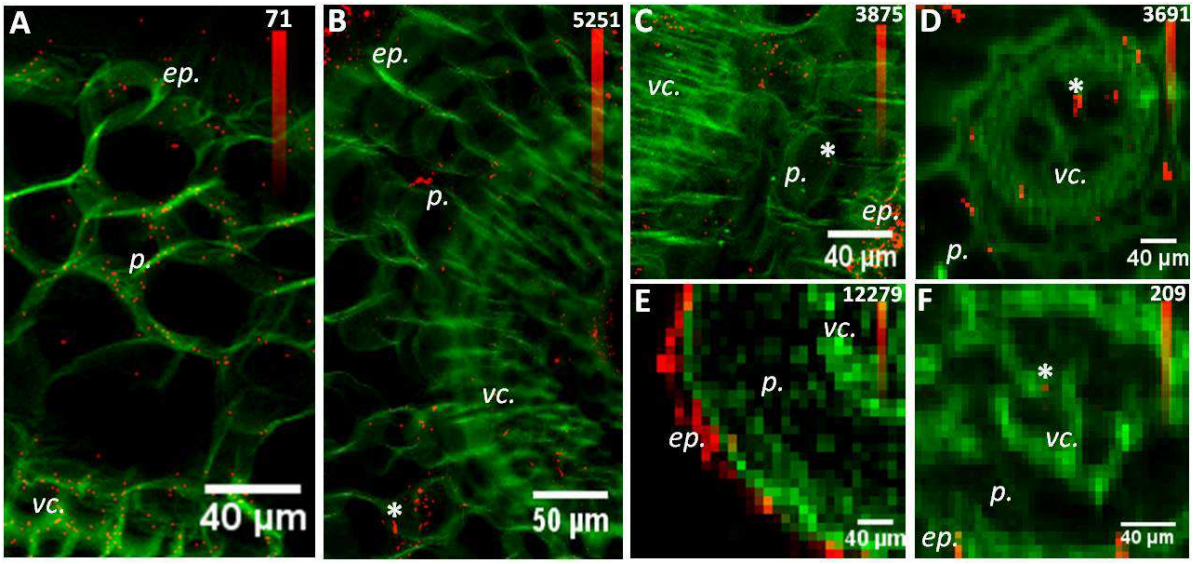


Figure 81 : Cartographie en µ-XRF de la répartition du titane dans des racines de blé cultivé en hydroponie. A. Racine témoin cultivée dans de l'eau ultrapure. Racines exposées à 100 mg/L de TiO_2 R20 (B), A25 (C), R35 (D), A140 (E) et R700 (F). En vert, la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge, la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). *, point le plus concentré en titane à l'intérieur de la racine (B : 4552 cps, C : 3133 cps, D : 2036 cps, F : 77 cps). Les images A, B et C ont été enregistrées sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm², les images D, E et F ont été enregistrées sur la ligne LUCIA avec une résolution de 5 x 5 µm². (*ep. épiderme, p. parenchyme, vc. cylindre central*)

Si l'on considère l'image issue du spectre de la racine de blé témoin, on constate effectivement qu'il n'y a que très peu de coups au niveau de la raie du titane (au maximum 71 coups) (Figure 81A). Cette valeur constitue le bruit de fond de la mesure. En comparaison, sur les images obtenues après exposition à R20 (Figure 81B), A25 (Figure 81C), R35 (Figure 81D), A140 (Figure 81E) et R700 (Figure 81F), les valeurs maximales obtenues au niveau de la raie du titane atteignent un maximum de 209 à plusieurs milliers de coups par point.

Lors d'une exposition aux NPs R20, A25 et R35, le titane est détecté en grande quantité (maximum supérieur à 3000 cps/pt contre 71 pour le témoin) dans l'ensemble de la coupe de racine de blé : dans le parenchyme et dans le cylindre central. A l'inverse, pour la racine exposée à A140, la majorité du titane (plus de 12000 cps/pt) est localisée sur l'épiderme. Il semble donc que les particules s'y soient adsorbées. Enfin, pour la plantule exposée à R700, la quantité de titane détectée est très faible (maximum 200 cps/pt), majoritairement au niveau de l'épiderme. La quantité de titane détectée dans le parenchyme est proche du bruit de fond, avec un maximum de 77 cps/pt. Ces résultats suggèrent donc que les microparticules de TiO_2 (A140 et R700) ne pénètrent pas dans la racine.

Ces données confirment les données précédemment acquises lors du dosage par µ-PIXE/RBS du titane accumulé dans les racines des plantules. Ainsi, l'hypothèse d'un **diamètre-seuil** pour la pénétration des NPs de TiO_2 est justifiée. Dans nos conditions, au dessus de 35 nm, le titane n'est plus détecté dans les racines des plantules.

D'autre part, comme nous l'avons précédemment décrit dans l'article présenté dans le paragraphe 1, le titane se répartit dans l'ensemble de la racine : à la fois dans le parenchyme et dans le cylindre central, suggérant sa potentielle translocation vers les parties aériennes.

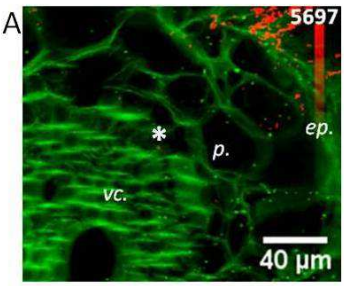
2.1.3. Influence du diamètre hydrodynamique : exposition dans du Hoagland

Rappelons que les expositions en hydroponie ont été effectuées avec des NPs préparées dans deux milieux : l'eau ultrapure, permettant d'obtenir des NPs relativement bien dispersées et le Hoagland, permettant d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance des végétaux mais dans lequel les NPs sont agglomérées sous forme de clusters de taille micrométrique. Ainsi, le diamètre hydrodynamique des NPs A25 dans l'eau ultrapure est de 27 nm alors que dans le Hoagland, il est supérieur à 1000 nm.

Etudier l'accumulation des NPs dans ces deux conditions permet d'évaluer l'importance du diamètre hydrodynamique des NPs - et donc de l'état d'agglomération - par rapport au diamètre nominal dans l'internalisation des nanomatériaux.

Des plantules de blé ont été exposées pendant une semaine en hydroponie à une suspension de NPs A25 à 100 mg/L diluée dans du Hoagland. Des coupes de racine ont ensuite été analysées par µ-XRF (Figure 82A) et le titane accumulé dans les racines a été quantifié par µ-PIXE/RBS (Figure 82B).

A



B

mg Ti/kg MS	Tem. H_2O	A25 H2O	A25 Hoag
CC	1,1 ± 1,1	17,6 ± 1,4	0 ± 0
P	1,8 ± 0,7	12,4 ± 1,5	18,9 ± 8,1

Figure 82 : Quantification et cartographie de la répartition du Ti dans une racine de blé exposée à des NPs de TiO_2 (A25, 100 mg/L) agglomérées. A. Etude de l'internalisation par µ-XRF. En vert la cartographie de la répartition du potassium retraçant les tissus végétaux et en rouge la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). *, point le plus concentré en titane dans la racine (1598 cps/pt). L'image a été enregistrée sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm². (*ep. épiderme, p. parenchyme, vc. cylindre central*). B. Quantification du titane dans les racines (CC. cylindre central, P. parenchyme) de blé exposé dans l'eau ultrapure (Tem) ou à A25 mis en suspension dans l'eau ou dans le Hoagland (Hoag).

Après exposition, on constate que le titane se trouve adsorbé sur l'épiderme de la racine mais également absorbé à l'intérieur de la racine en grande quantité (maximum 1598 cps/pt). La quantité de titane accumulée dans le parenchyme de la racine exposée à A25 dans le Hoagland est de 18,9 mg Ti/kg MS. Cette valeur est assez proche de la valeur obtenue après exposition à A25 dans l'eau ultrapure (12,4 mg Ti/kg MS). Néanmoins, la répartition du titane dans les racines diffère : lors de l'exposition dans le Hoagland, le titane est uniquement détecté dans le parenchyme, alors que lors de l'exposition dans de l'eau, le titane est également détecté en grande quantité (17,6 mg Ti /kg MS) dans le cylindre central. Ainsi, l'accumulation du titane après une exposition à A25 dans le Hoagland suit le même schéma de répartition que celui des autres NPs lors de l'exposition des plantules dans l'eau. Ceci confirme l'hypothèse précédemment posée : lorsque les NPs sont agglomérées, elles pénètrent dans la racine mais sont moins voire pas du tout transférées au cylindre central. Au contraire, lorsque les NPs sont bien dispersées, elles pénètrent dans la racine et migrent vers le cylindre central. Ainsi, après exposition à des agglomérats submicroniques de NPs (A25 dispersées dans du Hoagland ou R35 dans de l'eau), aucun titane n'est détecté dans le cylindre central des

plantules. Néanmoins, lorsque les agglomérats sont plus petits (≈200 nm pour A12 et R20 dans l'eau), du titane est détecté dans le cylindre central. Une autre hypothèse possible est que la faible proportion de NPs bien dispersées dans ces conditions puisse pénétrer dans la racine et migrer vers le cylindre central.

Ces résultats confirment donc que le diamètre hydrodynamique influence l'accumulation racinaire du titane, plus en terme de répartition qu'en terme de quantité.

2.2. Transfert du titane vers les parties aériennes du blé

Dans la première partie, nous avons montré que le titane internalisé dans les racines, après une exposition aux NPs A12 et R20, était transféré vers les parties aériennes. Nous avons également mis en évidence un diamètre-seuil (35 nm) à partir duquel les NPs ne s'accumulent plus dans les racines.

La quantification du titane dans les parties aériennes n'a pas pu être étudiée par µ-PIXE/RBS car les concentrations en titane étaient faibles et en dessous du seuil de détection de la méthode.

Le transfert vers les parties aériennes des NPs de TiO_2 de diamètre inférieur à la valeur seuil de 35 nm (A25 et R35) a été étudié par µ-XRF (Figure 83).

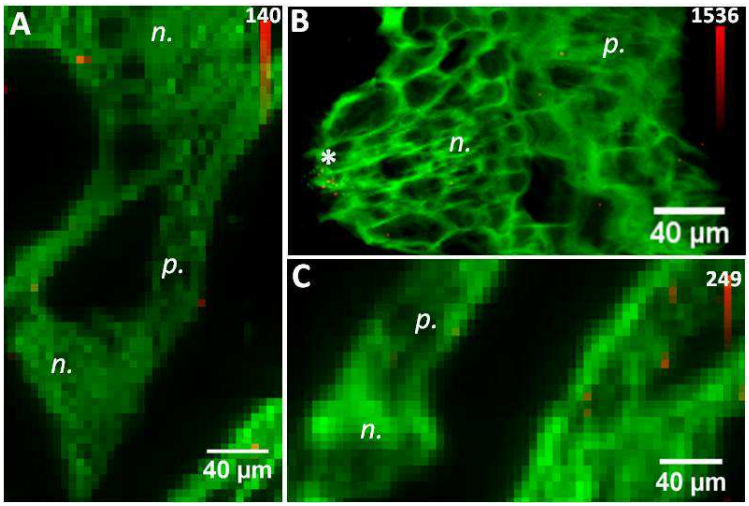


Figure 83 : Cartographie par µ-XRF de la répartition du titane dans les feuilles de blé. A. Feuille témoin d'une plantule cultivée dans l'eau ultrapure. Feuilles de plantules de blé exposées en hydroponie à 100 mg/L de NPs de TiO_2 A25 (B) ou R35 (C). En vert, la cartographie de la répartition du potassium retraçant les tissus végétaux et en rouge la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). *, point le plus concentré en titane à l'intérieur de la feuille (B : 1536 cps). Les images A et C ont été enregistrées sur la ligne LUCIA avec une résolution de 5 x 5 µm², l'image B a été enregistrée sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm². (*p. parenchyme, n. nervure*)

La cartographie de la feuille de blé témoin montre un nombre de coups maximum de 140 cps/pt ce qui représente le bruit de fond (Figure 83A). Plusieurs régions sont détectées dans la feuille de plantule exposée à A25, dans lesquelles le nombre de coups est beaucoup plus élevé : jusqu'à 1500 cps/pt (Figure 83B). Enfin, dans la feuille de plantule exposée à R35, le nombre de coups par point s'élève à 250 au maximum (Figure 83C). Ce chiffre indique que les NPs R35 n'ont que très peu été transférées vers les feuilles.

Il semble donc qu'au dessus d'un diamètre de **25 nm**, le transfert du titane internalisé au niveau des racines soit faible. Une autre explication est l'état d'agglomération des NPs lors de l'exposition. En effet, les NPs R35 sont des NPs très agglomérées dans le milieu d'exposition. La taille des agglomérats (>1 µm) a pu limiter le passage du cadre de caspary et/ou le transfert vers les parties aériennes.

2.3. Coordination du titane

Grace à ces différentes techniques (µ-XRF, µ-PIXE/RBS), nous avons pu mettre en évidence la présence de titane dans les plantules de blé. Néanmoins, une information importante nous manque : la spéciation du titane dans les tissus végétaux. Est-il présent sous forme d'ions, sous forme complexée ou encore sous forme de NPs ? Dans ce dernier cas, il est également intéressant de savoir si la NP a subi des modifications en surface et/ou en profondeur lors de son transfert du milieu d'exposition vers les racines, puis des racines vers les feuilles. La spectroscopie d'absorption des rayons X a été utilisée pour répondre à ces questions.

2.3.1. Analyse des nanopoudres de TiO_2 de référence

L'observation des spectres issus de bibliothèques (xraysweb.lbl.gov pour brookite et Ti foil) ou de pastilles des nanopoudres utilisées dans le cadre de cette thèse, montrent que chaque forme cristallographique du titane présente un spectre XAS spécifique. Il est ainsi possible d'identifier les différentes phases cristallines du TiO_2 (Figure 84). Ces spectres obtenus sur des pastilles de poudres de NPs représentent nos spectres de référence.

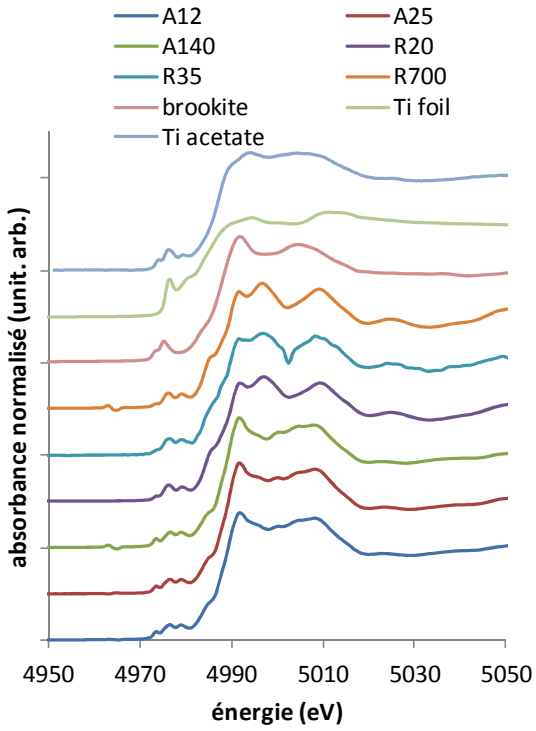


Figure 84 : Spectres XAS des nanopoudres de référence

Ces spectres présentent trois zones : la zone du pré-seuil (4970 à 4980 eV), la zone XANES (4980 à 5000 eV) et la zone EXAFS (au dessus de 5000 eV). Nous nous sommes focalisés sur l'analyse de la zone du pré-seuil. En effet, le pré-seuil des spectres des particules de TiO_2 de phase rutile et anatase est composé d'un triplet de pics. Dans le cas des particules anatase, ce triplet peut être décomposé en quatre contributions : A_1, A_2/A_3 et B, A_2 se présentant sous forme d'un épaulement, aux basses énergies, dans le pic A_3 (Figure 85A) (Choi *et al.*, 2004; Luca *et al.*, 1998). La zone du pré-seuil du spectre des particules rutile présente trois pics A_1, A_2 et A_3 (Figure 85B).

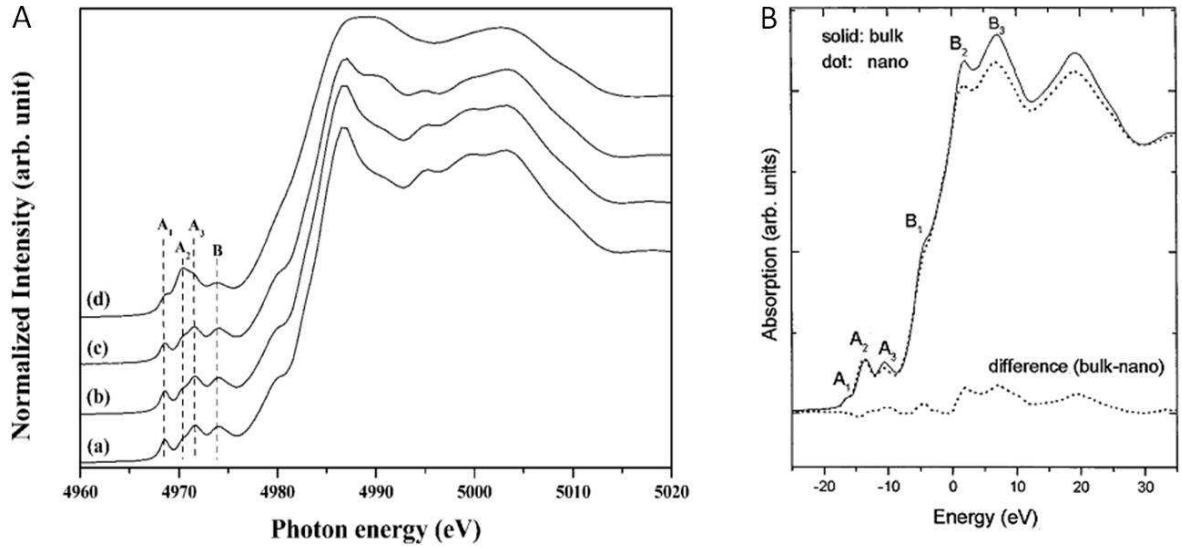


Figure 85 : Spectre XANES au seuil K du Ti. A. Spectres d'une référence de TiO_2 anatase (a) et de NPs de TiO_2 anatase de 30 nm (b), 12 nm (c) et 7 nm (d). La zone du pré-seuil présente un triplet : A_1, A_2/A_3 (A_2 étant un épaulement aux basses énergies de A_3) et B [Choi et al., 2004]. B. Spectres de référence de TiO_2 rutile (ligne continue) et de NPs de TiO_2 rutile (ligne pointillée) [Wu et al., 2011]

L'origine de ces pics ne fait pas consensus. Néanmoins, le pic A_1 est généralement attribué à la transition 1s vers $1t_{1g}$ (Chen *et al.*, 1997) et les pics A_2 et A_3 proviendraient de transitions 1s vers 3d après le mélange des orbitales 4p et 3d (Choi *et al.*, 2004; Wu, 2002). Ces deux derniers pics sont sensibles à la taille de la particule étudiée. Ainsi, plus la particule est petite, plus la proportion d'atomes de titane en surface est grande et plus les distorsions des unités TiO_6 sont importantes. Selon Choi et al. (Choi *et al.*, 2004), plus la particule anatase est petite plus le pic A_2 est grand. Selon Luca et al. (Luca *et al.*, 1998), plus la particule anatase est petite, plus le rapport d'intensités A_2/A_3 augmente. Si l'on compare les zones de pré-seuil de l'anatase et du rutile, celle du rutile a une amplitude plus importante (Figure 85B) (Wu, 2002) avec un pic A_2 prédominant. Les pré-pics des spectres de NPs de rutile diffèrent légèrement de ceux des spectres de TiO_2 rutile non nanoparticulaire : le pic A_2 est décalé vers les faibles énergies et l'amplitude de A_3 est moindre.

La Figure 86 présente les zones de pré-seuil des spectres XANES que nous avons obtenus sur les poudres anatase de référence. Les zones de pré-seuil ont été déconvoluées en 4 pics : A_1, A_2, A_3 et B, grâce au logiciel Fityk (Wojdyr, 2010).

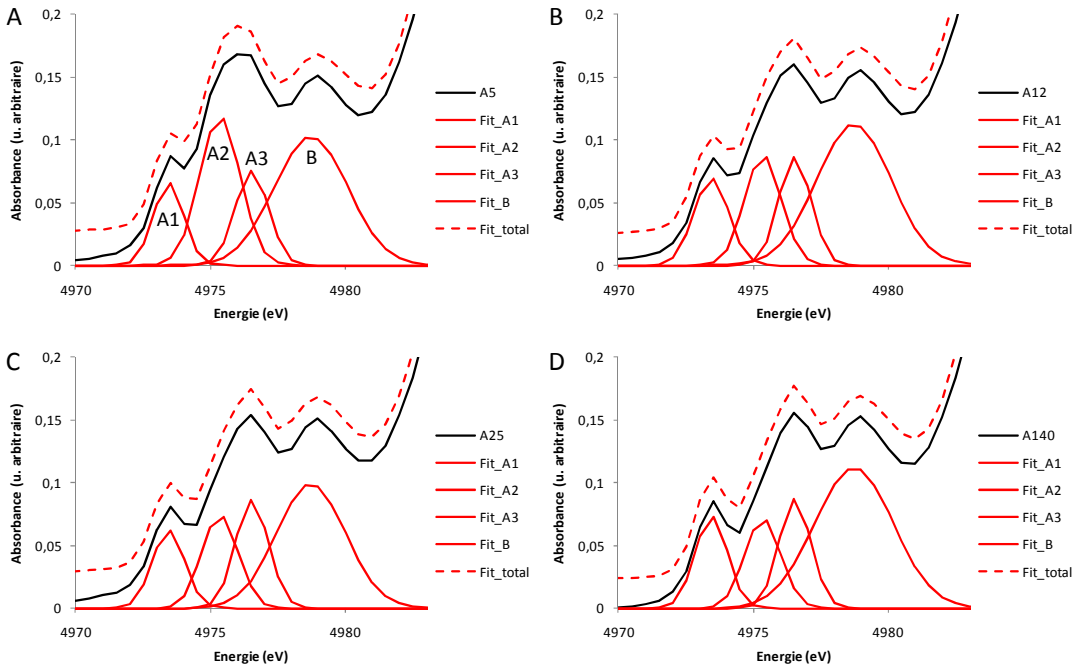


Figure 86 : Analyse de la zone du pré-seuil des spectres XAS obtenus sur les poudres de NPs de TiO_2 anatase de référence : A5 (A), A12 (B), A25 (C) et A140 (D)

Le résultat de cette déconvolution permet d'observer que les intensités des pics A_2 et A_3 varient en fonction du diamètre de la NP : le rapport d'intensité A_2/A_3 diminue lorsque le diamètre de la NP augmente. Cette évolution est représentée dans la Figure 87.

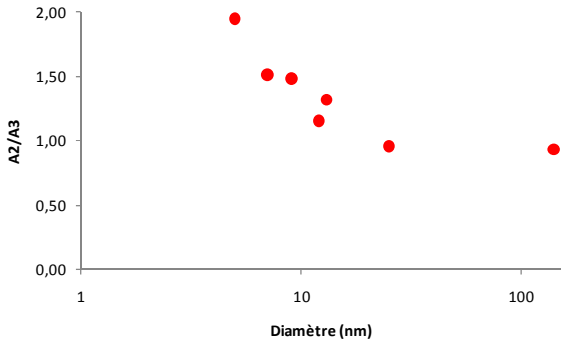


Figure 87 : Evolution du rapport d'intensité A_2/A_3 en fonction du diamètre de la particule de TiO_2 anatase.

Dans le cas des particules rutile, nous avons analysé les spectres obtenus sur des poudres de particules de 20, 35 et 700 nm (Figure 88).

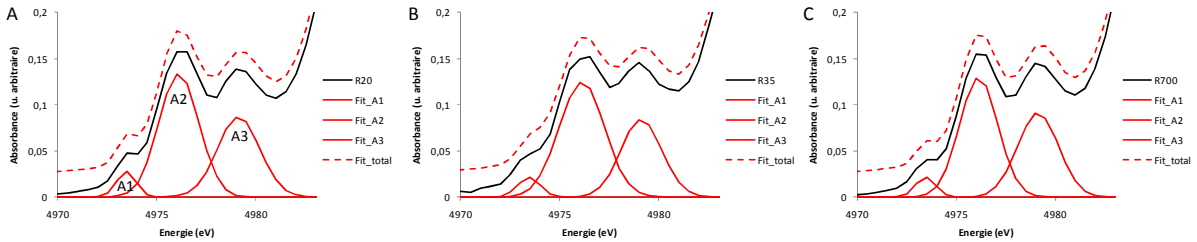


Figure 88 : Analyse de la zone du pré-seuil des spectres XAS obtenus sur les poudres de TiO_2 rutile de référence : R20 (A), R35 (B) et R700 (C).

La comparaison de la position du maximum du pic A_2 et de l'intensité du pic A_3 ne fait pas apparaître de différence entre NPs et microparticules. Il semble donc que les variations observées par Wu et al. (Wu, 2002) ne soient valables que pour des NPs de taille inférieure à 20 nm.

Ainsi, l'analyse des zones de pré-seuils sur les spectres expérimentaux obtenus sur les échantillons biologiques pourrait permettre de confirmer que le titane observé est bien sous forme de NPs de TiO_2, et d'en identifier la phase cristalline. S'il y a modification de la phase cristalline lors du transfert vers ou dans le végétal, cette modification sera visible. Ensuite, ils renseignent sur le diamètre de la NP, et donc indirectement sur une possible dissolution des NPs après transfert dans les végétaux : si les NPs se dissolvent alors leur taille diminue, ce qui se traduit pour des NPs anatase par une augmentation du rapport des amplitudes de A_2 par rapport à A_3, et pour les NPs rutile par une diminution de l'amplitude de A_3 et par un décalage de A_2 vers les basses énergies.

2.3.2. Analyse du titane dans les exsudats racinaires, les racines et les feuilles

Nous avons pu étudier, étape par étape, le devenir des NPs de la suspension initiale (contact avec les exsudats racinaires) jusqu'aux feuilles, en passant par les racines (Figure 89).

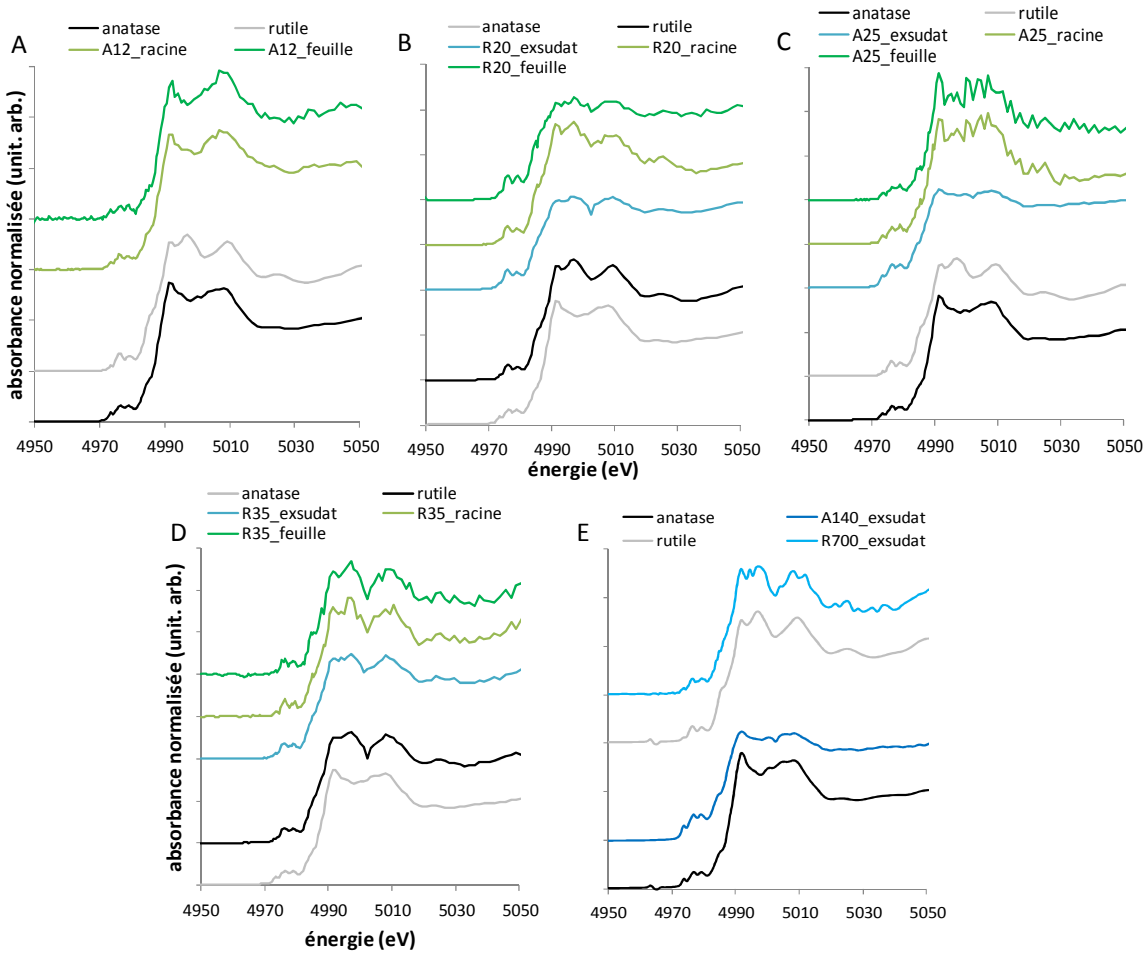


Figure 89 : Analyse en XAS du titane dans les exsudats racinaires, dans les racines et dans les feuilles de blé après une exposition de 7 jours à des suspensions de 100 mg/L de NPs A12 (A), R20 (B), A25 (C), R35 (D), A140 et R700 (E). *(unit. arb. unité arbitraire)*

Pour chacune des NPs testées est représenté le spectre XAS de la nanopoudre, le spectre d'une suspension de NPs après une semaine d'exposition dans le milieu de culture, c'est-à-dire après contact avec les exsudats racinaires, ainsi que les spectres du titane repéré par µ-XRF dans les racines et dans les feuilles du blé (Figure 89A, B, C, D). Finalement, les microparticules A140 et R700 n'ayant pas été observées dans les plantes, seuls les spectres des NPs obtenus dans les exsudats sont présentés (Figure 89E).

La qualité des spectres obtenus par analyse du titane dans les exsudats racinaires et dans les racines et les feuilles des plantes n'est pas suffisante pour qu'ils puissent être analysés en détail. En effet, la concentration en titane étant localement faible, les spectres obtenus sont très bruités. Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude du pré-seuil (Figure 90).

Dans les exsudats racinaires (Figure 90B), l'allure des zones de pré-seuil est comparable à celle obtenu sur les nanopoudres (Figure 90A), les NPs ont donc conservé leur phase cristalline. La déconvolution de ces spectres, ainsi que le calcul des rapports d'intensité des pics A_2 et A_3 permet de conclure que les NPs A25 et A140 ne se sont pas dissoutes dans les exsudats racinaires : le rapport A_2/A_3 est de 0,93 pour A25 et de 0,78 pour A140, contre 0,96 pour A25 et 0,93 pour A140 sur les spectres des pastilles de référence. La diminution de ce rapport dans le cas de A140 pourrait provenir de l'agrégation des particules dans les exsudats racinaires.

Dans les racines et dans les feuilles (Figure 90C, D), les concentrations en titane sont faibles, les spectres sont donc beaucoup plus bruités, surtout dans le cas des végétaux exposés aux particules anatase. L'interprétation des spectres est, de ce fait, délicate. Néanmoins, en recoupant les informations issues du pré-seuil et du seuil, il semble que le titane détecté dans les végétaux ait conservé sa structure cristalline et qu'il ne soit donc pas présent sous forme d'ions. D'autre part, les rapports d'intensité des pics dans la zone des pré-seuils ne varient pas, les NPs ne se sont donc pas dissoutes.

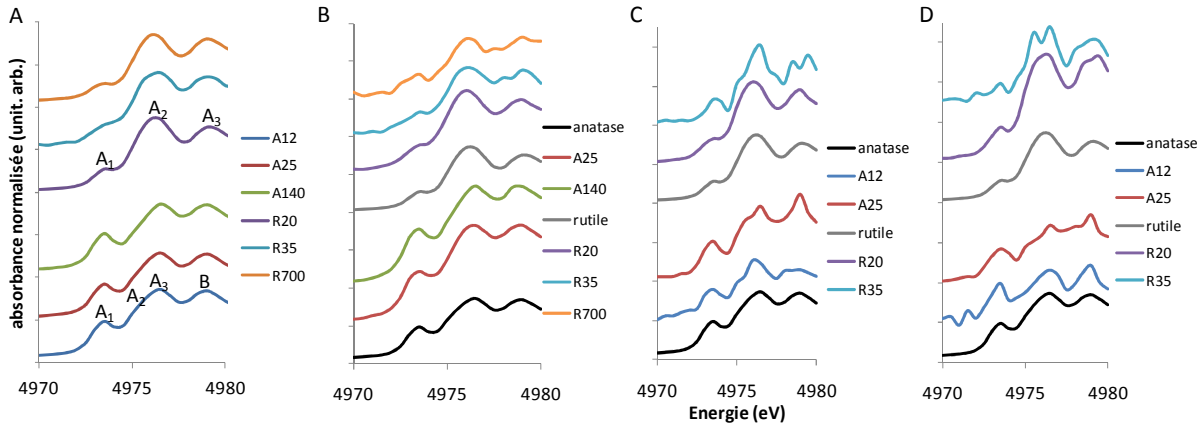


Figure 90 : Pré-seuil des spectres XAS obtenus sur les nanopoudres de référence de TiO_2 (A), après incubation dans les exsudats racinaires (B), ou dans les racines (C) et dans les feuilles (D) de blé.

2.4. Impact des NPs de TiO_2 sur le développement et la physiologie du blé

Les premiers résultats relatifs à l'impact des NPs de TiO_2 sur le développement et la physiologie du blé sont décrits dans l'article présenté dans le paragraphe 1. Ils montrent que la longueur des

racines est le seul paramètre modulé par l'exposition aux NPs de TiO_2 : les NPs (A12, R20) causent une augmentation de l'élongation racinaire.

Dans cette partie, nous présentons les résultats des tests mesurant l'impact des NPs de diamètre nominal supérieur à 20 nm sur le développement et la physiologie du blé.

Cette partie sera également l'occasion de vérifier s'il existe un lien entre effet sur le développement et internalisation des NPs. L'existence d'une telle corrélation, ou au contraire son absence, donnerait des indices sur le mode d'action des NPs.

2.4.1. Impact sur le développement : germination, longueur des racines, biomasse et évapotranspiration

Préalablement aux expositions, un test en vue d'optimiser la concentration des suspensions de NPs de TiO_2 a été mis en place. Ainsi, des plantules de blé ont été exposées pendant sept jours à 10, 50, 100, 500, 1000 et 2000 mg/L de NPs de TiO_2 A25 (Figure 91). Cette gamme de concentrations avait pour but de vérifier qu'il n'existait pas une concentration létale pour le blé et de choisir les concentrations d'exposition pour toutes les autres expériences.

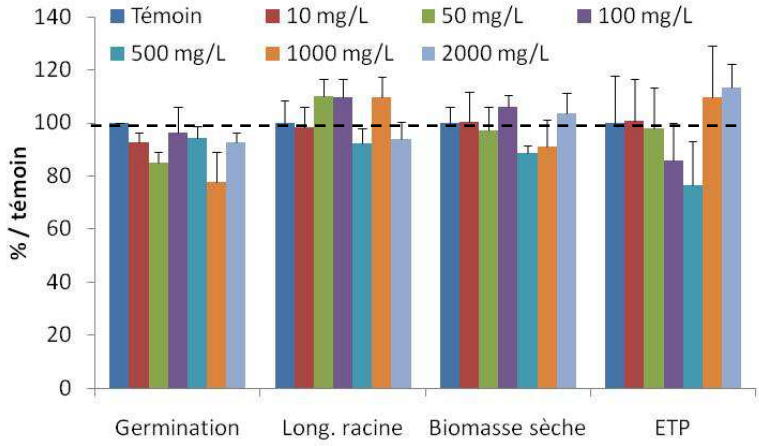


Figure 91 : Choix des concentrations d'exposition. Des graines de blé ont été exposées à une suspension de NPs de TiO_2 A25 à différentes concentrations (10, 50, 100, 500, 1000 et 2000 mg/L). Après 7 jours d'exposition, le taux de germination et la longueur des racines ont été mesurés. Les plantules ont ensuite été transférées dans des tubes contenant du Hoagland et après 7 jours, la biomasse et l'ETP ont été évaluées.

Les résultats sont semblables pour toutes les concentrations et quel que soit le test envisagé. Il n'existe pas d'effet sur les différents paramètres observés (germination, élongation racinaire, biomasse sèche, ETP) lié à de très fortes concentrations en NPs de TiO_2. La gamme de concentrations testée a donc été réduite aux trois valeurs les plus faibles : 10, 50 et 100 mg/L pour tous les tests de développement. Notons que ces valeurs sont extrêmement élevées par rapport aux valeurs attendues dans l'environnement (Gottschalk *et al.*, 2009) et représenteraient un cas de contamination aigue du milieu. En revanche, elles sont comparables à celles utilisées dans la bibliographie pour le même type d'étude.

Des graines de blé ont été exposées en hydroponie à des suspensions de particules de TiO_2 : A12, R20, A25, A140 et R700 (Figure 92). Pour plus de clarté, les valeurs présentées pour A12 et R20 dans l'article en paragraphe 1 ont été rajoutées sur ce graphe.

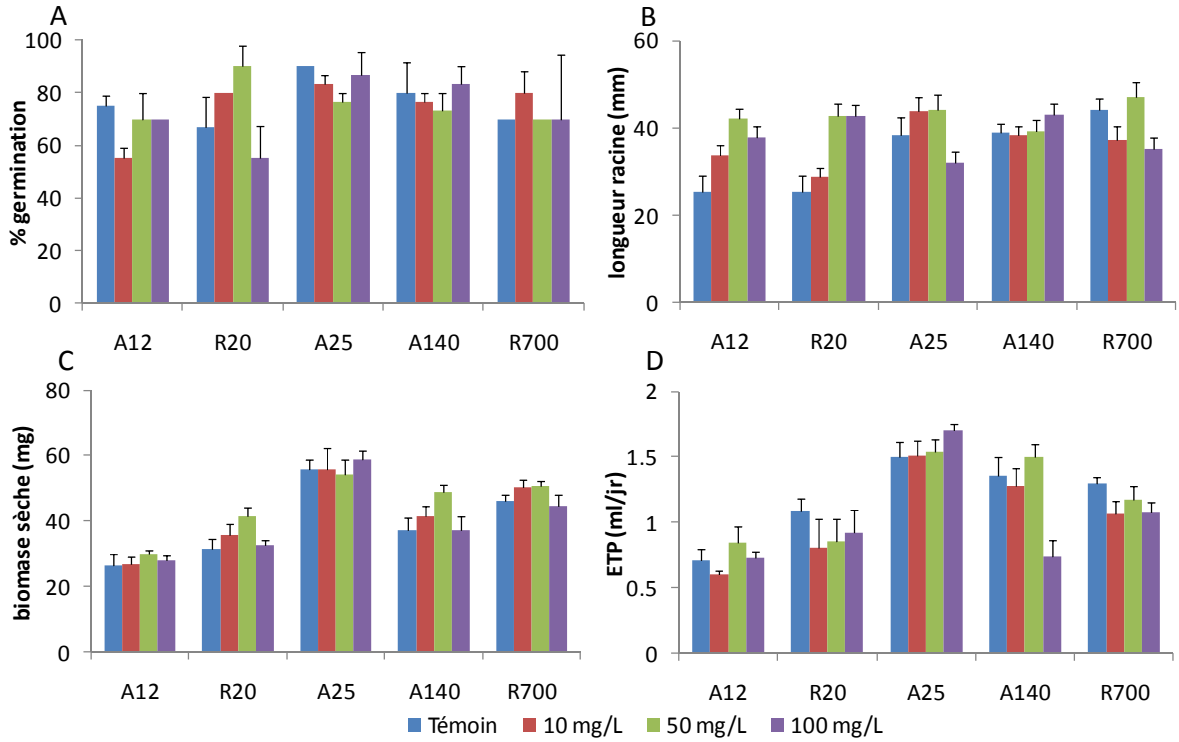


Figure 92 : Impact des particules de TiO_2 sur le développement de graines de blé en hydroponie. A. Impact sur la germination. B. Impact sur la longueur des racines. C. Impact sur la biomasse sèche. D. Impact sur l'évapotranspiration.

Cette série de tests confirme le fait que le taux de germination, la biomasse sèche et l'ETP ne sont pas des critères sensibles, dans nos conditions expérimentales, à la présence de NPs dans le milieu de culture.

En revanche, nous avons détecté une augmentation significative de la longueur des racines de blé pour les plantules exposées à 50 et 100 mg/L des NPs A12 et R20. Cette élongation n'est pas visible sur les plantules exposées aux autres particules.

Les valeurs moyennes de taux de germination, de longueur racinaire, de biomasse sèche et d'ETP sont respectivement de 75% (Figure 92A), 38 mm (Figure 92B), 40 mg (Figure 92C) et 1,1 mL/jour (Figure 92D). Pour les graines exposées à de fortes concentrations de NPs A12 et R20, la longueur des racines est accrue d'environ 70%.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélations entre internalisation des NPs et induction de l'élongation racinaire. En effet, les NPs A12, R20, A25 et R35 sont internalisées mais seules les NPs A12 et R20, les plus petites, provoquent une augmentation de la longueur des racines.

2.4.2. Impact sur la physiologie : photosynthèse et nutrition hydrominérale

Aucun effet n'a été détecté sur la **teneur en chlorophylle** des plantules exposées aux NPs A12 et R20. Les teneurs moyennes de chlorophylle A, de chlorophylle B et de caroténoïdes sont respectivement de 1,035 mg/g matière fraiche (MF), 0,200 mg/g MF et 0,385 mg/g MF. La quantité de chlorophylle totale s'élève donc à 1,620 mg/g MF. Le test a été renouvelé pour les particules de diamètre compris entre 25 et 700 nm (Tableau 19).

Tableau 19 : Contenu en pigments photosynthétiques (mg/g matière fraiche) dans les feuilles de blé de plantules exposées à 100 mg/L de différentes particules de TiO_2 (*Chl. A, chlorophylle A, Chl. B, chlorophylle B, carot., caroténoïdes, Chl. Tot., chlorophylle totale*).

	Chl. A	Chl. B	Carot.	Chl. Tot.
Témoin	1,027 ± 0,082	0,201 ± 0,014	0,381 ± 0,017	1,609 ± 0,112
A25	1,134 ± 0,134	0,225 ± 0,024	0,409 ± 0,036	1,768 ± 0,194
R35	1,121 ± 0,049	0,224 ± 0,005	0,408 ± 0,016	1,753 ± 0,070
A140	0,955 ± 0,021	0,191 ± 0,005	0,367 ± 0,005	1,513 ± 0,030
R700	0,982 ± 0,070	0,201 ± 0,010	0,363 ± 0,025	1,546 ± 0,105

A nouveau, aucune modulation du contenu en chlorophylle A, en chlorophylle B et en caroténoïdes n'a pu être détectée après une exposition de 7 jours à 100 mg/L à A25, R35, A140 et R700.

Nous avons également étudié la **nutrition hydrominérale** du blé cultivé dans l'eau ultrapure et exposé aux différentes NPs. Pour cela, nous avons dosé les différents cations (Figure 93A) et anions (Figure 93B) présents dans les racines et dans les feuilles du blé. La somme des cations comprend le dosage du sodium, de l'ammonium, du potassium, du calcium et du magnésium. La somme des anions comprend le dosage du chlore, du dioxyde d'azote, du nitrate, du dihydrogénophosphate et du sulfate.

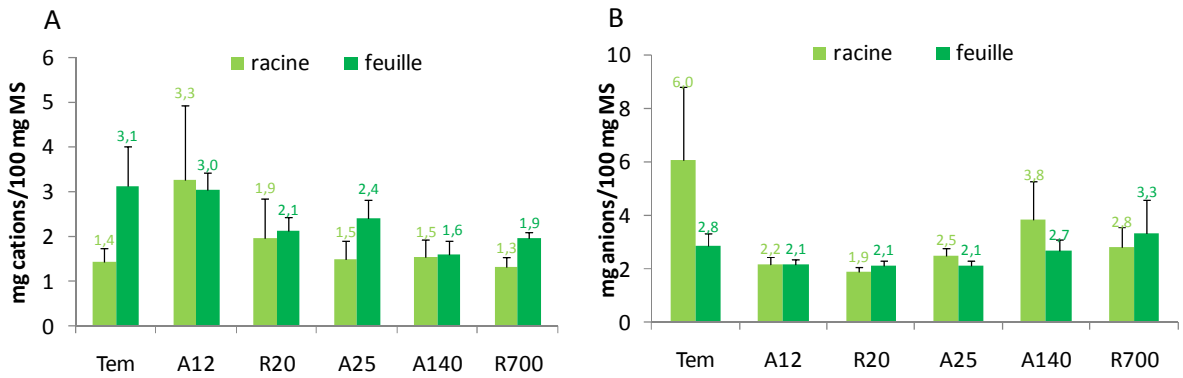


Figure 93 : Dosage des cations (A) et des anions (B) par chromatographie ionique dans les racines et les feuilles de blé.

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative dans la nutrition hydrominérale du blé suite à une exposition aux nanomatériaux. La somme des cations se situe autour de 2% aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Il en va de même pour la somme des anions qui est d'environ 2%.

2.5. Discussion des résultats

2.5.1. Internalisation des NPs dans les racines

Le contact s'effectue en solution entre la NP dont la surface est chargée négativement (potentiel zeta<0) et la surface des racines qui est chargée positivement (Campbell, 1995).

Les mécanismes régissant l'internalisation des NPs dans les racines sont encore méconnus. Plusieurs voies d'entrée ont déjà été évoquées dans la littérature comme par exemple, une pénétration sous l'effet de la pression osmotique ou par forces capillaires, ou bien une pénétration dans la racine par les pores (Nowack and Bucheli, 2007). On ne sait rien des deux premiers mécanismes mais le dernier est plus documenté. En effet, les parois de l'épiderme des racines sont percées de pores dont le diamètre moyen est d'environ 5 nm (Carpita *et al.*, 1979). Il existe également différentes autres structures (aquaporines, canaux ioniques, symporteurs) permettant le transport des solutés du milieu extérieur vers l'intérieur des cellules. Néanmoins, les NPs ont un diamètre supérieur au diamètre des pores. Cela signifie que les NPs A12, R20, A25 et R35 sont internalisées malgré que leur diamètre soit supérieur au diamètre des pores. Une hypothèse souvent évoquée est que les NPs sont capables de créer de nouveaux pores dans les racines ou bien d'élargir les pores existants (Figure 94) (Khodakovskaya *et al.*, 2009). On peut alors faire l'hypothèse que cette capacité à créer de nouveaux pores est proportionnelle à la réactivité de surface des NPs. Cette réactivité serait notablement accrue pour les NPs avec un diamètre de moins de 30 nm (Auffan *et al.*, 2009). Les particules les plus fines seraient donc plus à même de traverser l'épiderme et d'être accumulées dans les racines.

Les résultats relatés dans la bibliographie viennent confirmer ces hypothèses (Tableau 20). En effet, les études montrent qu'une grande diversité de NPs (Fe_2O_3, CeO_2, Ag, ZnO, $Ni(OH)_2$, Cu, TiO_2, Pd et $3Al_2O_3.2SiO_2$), de diamètre nominal compris entre 1 et 25 nm, sont également internalisées dans les racines des végétaux cultivés en hydroponie (Zhu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b; Yin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011a; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Lin and Xing, 2008; Kurepa *et al.*, 2010; Parsons *et al.*, 2010). De plus, certaines études ont comparé l'internalisation de NPs de deux diamètres différents. L'accumulation est toujours plus importante dans la plante exposée aux plus petites NPs. Ainsi, les racines de concombre exposées à des NPs de CeO_2 accumulent plus de cérium lorsque les NPs ont un diamètre de 7 nm (750 mg Ce/kg) que lorsqu'elles ont un diamètre de 25 nm (500 mg Ce/kg) (Zhang *et al.*, 2011b). De même, les racines de ray-grass accumulent plus d'argent après exposition à des NPs de 6 nm (900 mg Ag/kg) qu'après exposition à des NPs de 25 nm (500 mg Ag/kg) (Yin *et al.*, 2011).

2.5.2. Transport radial des NPs dans les racines

Une fois que les NPs de TiO_2 de moins de 35 nm de diamètre ont pénétré dans la racine, nous avons démontré qu'elles migrent vers le cylindre central. Deux voies de transport sont alors possibles : soit par la voie apoplasmique, soit par la voie symplasmique (Zhang *et al.*, 2011b). Dans la voie symplasmique, les NPs transitent d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes dont le diamètre moyen est d'environ 50 à 60 nm (Figure 94) (Wang *et al.*, 2011a). Dans la voie apoplasmique, les NPs circulent dans les espaces intercellulaires et les parois. Néanmoins, cette voie ne peut être suivie jusqu'aux éléments conducteurs. En effet, il existe un obstacle physique à cette voie entre le parenchyme et le cylindre central. Il s'agit du cadre de caspary qui est constitué de parois épaissies (subérine) hautement hydrophobes des cellules de l'endoderme (Figure 94). Lors des échanges hydrominéraux, les flux sont donc forcés de passer de la voie apoplasmique à la voie symplasmique pour franchir cette barrière. Cette structure exerce donc un rôle de régulation des flux hydriques. Les observations en MET montrent que les parois à cet endroit mesurent entre 1500 et 2000 nm contre 400 nm pour les parois cellulaires.

Si les NPs A12, R20 et A25 franchissent avec succès cet obstacle, il n'en est pas de même pour la NP R35. En effet, R35 n'est pas détectée dans le cylindre central des racines ni dans les feuilles, ce qui signifie qu'elle ne passe pas ce barrage. On peut alors imaginer que cette NP, du fait de son diamètre, a eu suffisamment d'énergie pour endommager des parois de 400 nm mais pas la paroi épaissie de 2000 nm du cadre de caspary. Cette NP s'accumule donc dans le parenchyme sans possibilité d'être transférée vers les parties aériennes. Cette hypothèse est confirmée par la surconcentration en titane constatée dans le parenchyme des racines exposées aux NPs R35 (109,3 mg Ti/kg MS) par rapport aux racines exposées aux plus petites NPs.

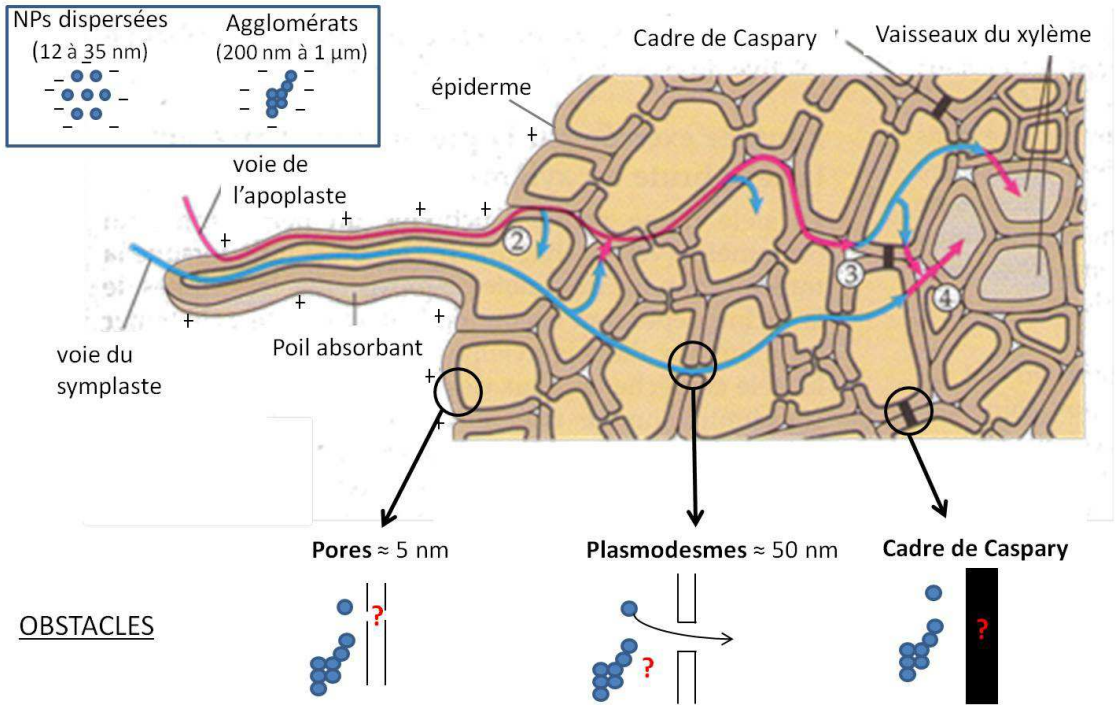


Figure 94 : Pénétration des NPs dans la racine et transport radial (adapté de Campbell, 1995)

Une autre hypothèse peut aussi être avancée pour justifier le fait que les NPs R35 n'atteignent pas le cylindre central. Cette hypothèse a trait au diamètre hydrodynamique. Nous avons démontré qu'en fonction de leur état d'agglomération, les NPs se répartissaient différemment dans les racines des plantes. Or, lorsque les plantes sont exposées à des NPs que nous avons qualifiées comme étant agglomérées (>1 µm), la suspension de NPs contient en réalité un mélange de NPs agglomérées et de NPs dispersées. Il reste donc à définir si, parmi ces deux populations de NPs, celles qui sont accumulées dans les racines sont les quelques NPs dispersées, ou si des agglomérats de NPs peuvent également être accumulés. Nos observations sont plutôt en faveur du second scénario. En effet, en MET, on distingue des NPs agglomérées dans les tissus végétaux. De plus, dans notre expérience, il existe une différence de répartition du titane entre le parenchyme et le cylindre central selon le degré d'agglomération des NPs en suspension. Ainsi, les NPs non agglomérées (A25) auraient une progression radiale plus aisée dans la racine que les NPs faiblement agglomérées (200 nm, A12-R20) et les NPs fortement agglomérées (1 µm, R35) verraient leur progression stoppée dans le parenchyme.

La combinaison d'un diamètre nominal important (donc d'une réactivité de surface moindre) et d'un fort état d'agglomération peut expliquer que les NPs R35 ne puissent traverser le cadre de Caspary.

2.5.3. Concentration des NPs dans les racines

Nos résultats montrent que les NPs s'accumulent dans les racines à hauteur de 100 mg Ti/kg MS.

Dans la bibliographie (Tableau 20), les concentrations dosées par ICP-MS s'échelonnent de 140 mg Zn/kg à 900 mg Ag/kg pour le ray-grass (Yin *et al.*, 2011; Lin and Xing, 2008) voire même 38.138 mg Ni/kg dans le prosopis (Parsons *et al.*, 2010). Sans surprise, ces concentrations sont beaucoup plus élevées que celles mesurées dans notre étude puisque dans notre cas, nous n'avons mesuré que la quantité de titane effectivement accumulée dans les racines, et non la somme du titane accumulé et adsorbé à la surface de la racine. Le dosage du titane adsorbé sur l'épiderme de la racine de blé après une exposition de 7 jours à 100 mg/L A12 s'élève à 911,2 mg Ti/kg. Ce chiffre peut donc expliquer la différence notable avec les résultats de la littérature.

L'étude de l'accumulation des NPs dans les racines met également en évidence l'influence du diamètre nominal dans l'accumulation. En effet, pour les plus petites NPs les concentrations sont supérieures à 100 mg/kg. Pour les NPs plus grosses comme les NPs de Cu de 60 nm, les auteurs retrouvent respectivement 8 et 30 mg Cu/kg dans le haricot et le blé (Lee *et al.*, 2008). Ces NPs sont donc internalisées dans des proportions moindres par rapport aux NPs ayant un diamètre ≤ 25 nm.

2.5.4. Transport vertical des NPs vers les feuilles

Les NPs les plus petites (≤25 nm) atteignent finalement les vaisseaux conducteurs de la sève et seraient transférées vers les parties aériennes avec les flux nutritifs. La montée des nutriments vers les parties aériennes est contrôlée par la capacité d'évapotranspiration des végétaux ; il semble en être de même pour les NPs. Les observations MET montrent effectivement de grandes quantités de NPs dans les vaisseaux. Les NPs migreraient ensuite dans les organes aériens selon les voies apoplasmique et symplasmique puisque les observations MET des coupes de feuilles montrent des NPs dans les parois et à l'intérieur des cellules des feuilles.

Tableau 20 : Récapitulatif de la bibliographie sur l'accumulation et le transfert des NPs

NP	Ø nominal (nm)	Ø hydro.	Végétal	Internalisation (racine)	Translocation (feuille)	Structure NP	Ref.
Fe_3O_4	20	Agglo : 2 µm	Citrouille	Oui Expo 500mg/L 45,4% racine	Oui Expo 500mg/L 0,6% feuille	?	(Zhu *et al.*, 2008)
Fe_3O_4	20	Agglo : 2 µm	Haricot de Lima	Non	Non	?	(Zhu *et al.*, 2008)
Fe_3O_4	25	Agglo : 1 µm	Ray-grass Citrouille	Oui Expo 100mg/L Raygrass : 10 mol/kg Citrouille : 27 mol/kg	Non	Avec surface RG : NP Citrouille: oxydé	(Wang *et al.*, 2011a)
Mullite	[30-45]	?	Haricot mungo	?	Oui	?	(Dey *et al.*, 2011)
CeO_2	7 / 25	Agglo : 1 à 2 µm	Concombre	Oui Expo 200mg/L 25 nm : 500 µg Ce/g MF 7 nm : 750 µg/g MF	Oui 25 nm : 100 ng/g MF 7 nm : 180 ng/g	?	(Zhang *et al.*, 2011b)
CeO_2	7	?	Soja	Oui	Oui : plantule Expo à 4g/L : 500 mg Ce/kg MS	Avec surface, NP	(Lopez-Moreno *et al.*, 2010a)
CeO_2	7	?	Luzerne, Mais, Concombre, Tomate	Oui	Oui ; Expo 4g/L L. : 7000 mg Ce/kg MS M. : 200 mg/kg C. : 400 mg/kg T. : 3000 mg/kg plantule	Avec surface, NP ds racine	(Lopez-Moreno *et al.*, 2010b)
ZnO	8	?	Soja	Oui	Oui, plantule Expo 4g/L 150 mg Zn/kg MS	Avec surface, Oxydé	(Lopez-Moreno *et al.*, 2010a)
ZnO	19	900 nm	Ray-grass	Oui Expo 1g/L 140 mg Zn/kg	?	NP ds racine (MET)	(Lin and Xing, 2008)
Ag	6 / 25	?	Ray-grass	Oui Expo 40mg/L 6nm : 900 mg/kg MS 25 nm : 500 mg/kg MS	Oui 6 nm : 22 mg/kg MS 25 nm : 27 mg/kg	En coupe, sous forme oxydée	(Yin *et al.*, 2011)
$Ni(OH)_2$	0,9 / 2,5 / 8,7	?	Prosopis	Oui Expo 0,10g 38183 mg Ni/kg MS	Oui Expo 0,10g 803 mg Ni/kg MS	Avec surface, Oxydation NP selon enrobage	(Parsons *et al.*, 2010)
Cu	60	?	Haricot mungo, Blé	Oui, Expo 1g/L Haricot : 8 mg/kg Blé: 30 mg/kg	?	NP ds racine (MET)	(Lee *et al.*, 2008)
TiO_2	2,8	?	*Arabidopsis*	Oui	Oui	?	(Kurepa *et al.*, 2010)
Pd	[1-12] /1000	?	Orge	?	Oui Expo 50 µmol/L: [1-12] : 300 mg/kg MS 1µm : 16 mg/kg	?	(Battke *et al.*, 2008)

Concernant le transfert vers les parties aériennes dans la littérature (Tableau 20), toutes les NPs testées de diamètre ≤25 nm sont transférées vers les feuilles, à l'exception de NPs Fe_3O_4 de 25 nm lors d'exposition de plantules de citrouille (Wang *et al.*, 2011a). Chez la même plante, avec le même

type de NPs, le transfert des racines aux feuilles est effectif lorsque le diamètre est de 20 nm (Zhu *et al.*, 2008). Ce résultat souligne encore l'importance du diamètre nominal dans le transport des nanomatériaux ainsi que l'existence d'une zone critique où les NPs acquièrent réellement une plus grande réactivité de surface que le bulk.

En ce qui concerne les plus grosses NPs, l'étude du transfert des NPs Cu (60 nm) n'a pas été réalisée (Lee *et al.*, 2008). Dans l'article de Dey et al., le transfert et l'accumulation des NPs de mullites (30-45nm) a été étudié par EDS (Dey *et al.*, 2011). Malheureusement, cette technique est très peu adaptée à ce genre d'étude et les résultats qui en sont issus, peu fiables. Il n'y a donc pas d'informations concernant le transfert des NPs de plus de 25 nm de diamètre dans la littérature.

2.5.5. Structure du titane

Concernant les analyses XAS de la littérature (Tableau 20), elles révèlent deux types de comportement des NPs : soit les NPs subissent des oxydations et dissolutions dans le milieu d'exposition, au contact des racines ou bien au sein du végétal, soit les NPs sont complètement inertes. Ainsi, certaines NPs sont connues pour être sujette à dissolution dans les milieux biologiques (Ag, ZnO,…) et la forme retrouvée dans la plante est la forme oxydée (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2011). A l'inverse, certaines NPs sont connues pour leur stabilité (CeO_2, TiO_2,…) et sont retrouvées sous forme de NPs dans les tissus végétaux (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a). C'est le cas des NPs de TiO_2 dans notre étude qui conservent leur structure aussi bien au contact des exsudats racinaires, que dans les racines et dans les feuilles.

Lorsque les NPs sont sujettes à dissolution, on peut alors considérer que les végétaux subissent une contamination comparable à celle provenant des éléments trace métalliques correspondants. Les effets d'une telle contamination sont bien documentés. Si, comme dans notre cas, les NPs conservent leur structure, on se trouve face à une contamination d'un genre nouveau qui soulève de nombreuses questions. Sont-elles bioaccumulées dans les végétaux, transférées à la chaine trophique et/ou bioamplifiées tout au long de cette chaine ? Dans la littérature, une seule étude relate un transfert trophique de NPs. Cette étude porte sur le transfert des NPs Au. Les auteurs constatent que les NPs sont transférées du milieu d'exposition en hydroponie à des plants de tabac et aux chenilles qui les consomment avec un phénomène de bioamplification (Judy *et al.*, 2011). Ainsi, en cas de contamination chaque maillon de la chaine trophique concentrerait les NPs dans son organisme de façon plus importante que le précédent, menant ainsi à la contamination de tout l'écosystème. Cet aspect n'a pas été étudié sur les NPs de TiO_2. Néanmoins, ces NPs étant inertes, elles pourraient également être sujettes à ce phénomène de bioamplification.

2.5.6. Impact des NPs sur le développement du blé

Les résultats issus de la bibliographie concernant l'impact des NPs sur le développement et la physiologie des végétaux sont très divers (Tableau 21). Ce sont généralement les paramètres de longueur (racine, tige, feuille) qui sont les plus étudiés. Il existe ainsi deux grandes catégories de résultats relayés par la littérature.

Les auteurs évoquent parfois une diminution de la germination, de l'élongation de la plantule et de la biomasse pour des expositions à des suspensions de NPs Ag, Zn, ZnO, Cu, ZVI et Pd (Battke *et al.*, 2008; El-Temsah and Joner, 2010; Lee *et al.*, 2008; Lin and Xing, 2007; Lin and Xing, 2008; Yin *et al.*, 2011). A l'inverse, d'autres auteurs ont mis en évidence une induction de ces paramètres après exposition à des NPs CeO_2, de TiO_2 et $Ni(OH)_2$ (Parsons *et al.*, 2010; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Gao *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2005b). La nature chimique des NPs peut en partie expliquer ces différences de comportement. En effet, les effets néfastes sont généralement constatés pour une exposition à des NPs solubles (Ag, Cu, Zn) alors que les effets d'induction sont plutôt visibles après exposition à des NPs inertes. Ainsi, les ions provenant de la dissolution des NPs pourraient être à l'origine des effets toxiques. Les NPs inertes auraient un effet physique (création de pores dans les parois par exemple) sur les plantes pouvant expliquer un meilleur développement. Ces effets physiques existent peut être également chez les NPs solubles mais sont dominés par les effets délétères des ions.

D'autre part, l'impact d'un même type de NP diffère selon l'espèce végétale sur laquelle les tests sont effectués. Ainsi, une exposition à des NPs de CeO_2 provoque une augmentation de l'élongation racinaire du colza, du concombre et du maïs, alors qu'elle diminue l'élongation racinaire de la tomate et du ray-grass (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b). Il semble donc que les espèces végétales présentent une sensibilité variable aux NPs. Cette sensibilité est peut être à mettre en regard d'une différence d'accumulation. En effet, dans cette étude, l'accumulation de cérium est plus importante chez la tomate et le ray-grass. Ainsi, l'inhibition de l'élongation racinaire est peut être due à une forte accumulation de cérium dans les plantules.

Dans notre cas, l'exposition du blé à des NPs de TiO_2 a entrainé une augmentation de l'élongation racinaire pour les NPs ayant un diamètre ≤20 nm. La germination, la biomasse et l'ETP n'ont pas été impacté.

Une explication pouvant justifier cette induction racinaire est que les plus petites NPs (A12 et R20), si elles sont effectivement les plus réactives, peuvent endommager les racines de façon plus importante que les NPs plus grosses (A25 et R35) lors de leur pénétration. Une hypothèse que nous avions émise est que les petites NPs en pénétrant endommageaient fortement les parois laissant ainsi passer un flux hydrominéral plus important qui aurait pu expliquer une élongation racinaire accrue. Néanmoins, nos mesures concernant la somme des anions et des cations détectés dans les racines et dans les feuilles n'ont pas permis de vérifier cette hypothèse. De plus, la biomasse sèche reste inchangée. C'est peut-être la quantité d'eau contenue dans les racines qui a augmenté. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait faire la différence entre biomasse fraiche et sèche pour évaluer le contenu en eau des racines. Une autre hypothèse est que les NPs peuvent perturber les hormones de croissance sécrétées dans les racines. Il serait donc intéressant de doser l'auxine dans les racines par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse) par exemple.

Dans notre étude, on ne peut pas corréler accumulation des NPs dans les végétaux et effets sur le développement. En effet, les NPs A12, R20, A25 et R35 sont internalisées dans les racines mais seules les NPs A12 et R20 provoquent une induction de l'élongation racinaire.

Tableau 21 : Récapitulatif de la bibliographie sur l'impact des NPs sur le développement et la physiologie

NP	Ø nom.	Végétal	Résultats	Ref.
Ag	6 / 25/ 5000	Ray-grass	**Elongation** (expo 40 mg/L) : Plantule : diminution (Ctl>5µm>25nm>6 nm) de 5,5 à 3,5 cm Racine : diminution (Ctl>5µm>25nm>6 nm) de 7,5 cm à 1 cm **Biomasse :** Plantule : diminution (Ctl>5µm>25nm>6 nm) de 12 à 17 mg Racine : diminution (Ctl>5µm>25nm>6 nm) de 5 cm à 18 mg	(Yin *et al.*, 2011)
Fe_2O_3	25 bulk	Raygrass Citrouille	**Stress oxydant** : Augmentation Activité SOD, CAT et quantité MDA → + prononcé qd 25 nm / bulk	(Wang *et al.*, 2011a)
$Ni(OH)_2$	0,9/2, 5 /8,7	Proso-pis	**Elongation :** Plantule : pas de différence ; Racine : augmentation (+ 0,7cm) **Chlorophylle :** Augmentation (1 condition / 9) de 63,9 à 84,4 µg/g MS	(Parsons *et al.*, 2010)
ZnO / CeO_2	8 / 7	Soja	**Elongation** ZnO : Induction à faible concentration, inhibition aux fortes concentrations ; CeO_2 : Augmentation longueur racine	(Lopez-Moreno *et al.*, 2010a)
CeO_2	7	Luzerne, Maïs, concomb re, tom.	**Germination :** Diminution pour maïs, tomate et concombre **Elongation** Racine : augmentation pour concombre et maïs, diminution pour tomate Tige : Augmentation pour concombre, ray-grass et maïs	(Lopez-Moreno *et al.*, 2010b)
ZnO	19	Ray-grass	**Biomasse** Diminution de biomasse aérienne et racinaire	(Lin and Xing, 2008)
Cu	60	Haricot, Blé	**Elongation** Diminution plantules de 60%	(Lee *et al.*, 2008)
Al/ Al_2O_3 Zn/ ZnO	18/60 35/20	Radis, Colza Raygrass Laitue Maïs Concom bre	**Germination** Al/Al_2O_3 : Aucun effet Zn/ZnO : Diminution pour ray-grass et maïs **Elongation** Al/Al_2O_3 : Aucun effet Al_2O_3, Augmentation pour Al sur radis et colza, Diminution pour Al sur ray-grass, laitue, maïs Zn/ZnO : Diminution voire inhibition pour toutes les espèces	(Lin and Xing, 2007)
Al_2O_3 / SiO_2/ Fe_3O_4/ ZnO	150/ 43/ <50/ 44/ 820	*Arabido.*	**Germination :** Inhibition uniquement avec ZnO-NP (pas avec P) **Elongation :** Racine : Induction avec Al_2O_3, Inhibition avec SiO_2, Fe_2O_3 et ZnO-NP **Nombre feuilles :** Pas effet sauf inhibition avec ZnO	(Lee *et al.*, 2010a)
ZVI / Ag	1/5/ 20	Raygrass Lin Orge	**Germination** Diminution avec ZVI à partir 500 mg/L. ZVI aucun effet sur lin, faible diminution sur orge pour NPs 5 et 20 nm, diminution pour RG qd NP 1 nm **Elongation** : Diminution racine et plantule avec ZVI	(El-Temsah and Joner, 2010)
Mullite	[30-45]	Haricot mungo	**Germination** : diminution dans 3 conditions/7 **Elongation** : racine, augmentation ou inhibition // humidité	(Dey *et al.*, 2011)
Pd	[1-12] /1000	Orge	**Elongation** Diminution longueur des feuilles marquée pour NP, moins pour P	(Battke *et al.*, 2008)
TiO_2	5	Epinard	Induction **croissance**, **photosynthèse**, **métabolisme azoté**, Diminution du **stress oxydant**	(Gao *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2005b; Lei *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006)
Fe_3O_4	8	Maïs	Diminution du contenu en **chlorophylle**	(Racuciu and Creanga, 2007b)

Nos résultats vont dans le sens de ceux obtenus après exposition d'épinards à 250 mg/L de NPs de 5 nm. Les auteurs constatent une induction de la germination et de la biomasse (Gao *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2005). Ces deux critères n'ont cependant subit aucune modification lors de nos expositions. Les NPs utilisées dans nos travaux sont de 2 à 4 fois plus grosses que celles utilisées sur les épinards. Etant plus grosses, leur réactivité est peut être moins importante et les effets constatés

sur les végétaux moins prononcés. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étendre notre étude à des NPs de diamètre < 10 nm.

Une autre étude (Seeger *et al.*, 2009) conclut que 100 mg/L de NPs de TiO_2 (25 nm) n'ont aucun effet sur la biomasse et l'ETP. Ces résultats concordent avec les nôtres.

Enfin, une dernière étude met en évidence une diminution de la croissance foliaire et de l'ETP sur le maïs après exposition à des NPs de TiO_2 de 25 nm (Asli and Neumann, 2009). Ces résultats sont donc en contradiction avec les autres. Néanmoins, il n'y a pas de caractérisation des NPs ni de détails sur leur préparation. Il n'est donc pas possible de savoir d'où peuvent provenir les différences.

2.5.7. Impact des NPs sur la physiologie du blé

Enfin, les résultats concernant l'impact des NPs sur la physiologie des végétaux dépendent également du type de NP et de l'espèce végétale utilisée dans les tests. Des recherches poussées ont été menées sur l'impact des NPs de TiO_2 sur l'épinard. Elles mettent en évidence que l'induction de la croissance constatée sur ces végétaux est corrélée avec un métabolisme azoté (Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) et une photosynthèse plus efficaces (Su *et al.*, 2007a; Su *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2007b). Dans notre étude, la photosynthèse n'est pas affectée par l'exposition aux NPs. Une fois encore, ces différences d'impact sont peut être liées à la taille des NPs.

D'autres résultats ont été obtenus indiquant soit une augmentation de la chlorophylle après exposition à des NPs $Ni(OH)_2$ (Parsons *et al.*, 2010) soit une diminution après exposition à des NPs de Fe_2O_3 (Racuciu and Creanga, 2007c; Racuciu and Creanga, 2007b; Cotae and Creanga, 2005). Néanmoins, il manque des informations cruciales dans ces articles pour déterminer les conditions d'exposition. Ainsi, l'article de Parsons ne rapporte ni concentration, ni temps d'exposition et ceux de l'équipe roumaine donnent une concentration en nombre de particules par litre.

De plus, aucun effet n'a été constaté sur le stress oxydant lors de notre étude alors qu'il est souvent cité comme mécanisme d'action des NPs (Jin *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008). Il existe deux explications à ce résultat : soit il n'y a pas eu de stress oxydant, soit celui-ci a été régulé entre le début de l'exposition et le moment où le dosage a été réalisé (24h après le début de l'exposition).

2.5.8. Influence des caractéristiques physico-chimiques des NPs sur leur impact sur le blé

Notre étude a montré que l'impact des NPs de TiO_2 sur le blé cultivé en hydroponie variait en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NPs.

Le **diamètre nominal** est un paramètre essentiel lorsque l'on veut déterminer l'impact des NPs sur les végétaux. En effet, nous avons montré que les NPs les plus petites étaient responsables de plus d'effets sur le blé. Les plus petites NPs sont accumulées dans les racines et transférées vers les feuilles et elles induisent également l'élongation racinaire du blé. Néanmoins, selon le critère considéré, le diamètre-seuil diffère. Ainsi, l'induction de l'élongation racinaire n'est visible que lors d'une exposition aux NPs ayant un diamètre nominal ≤20 nm. L'accumulation dans les racines n'est possible que pour les NPs dont le diamètre nominal est ≤35 nm. Enfin, le transfert vers les parties

aériennes n'est visible que pour les NPs dont le diamètre nominal est ≤25 nm. Les microparticules (A140 et R700) n'ont aucun impact sur le développement et la physiologie du blé et ne sont pas accumulées dans les tissus végétaux.

Les impacts des différentes NPs testées sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 22). On constate donc que plus la NP est petite plus ses interactions avec le blé sont importantes.

Tableau 22 : Classement des NPs selon les résultats obtenus dans cette étude

1	A12	Induction élongation racinaire (+67%) Internalisation dans les racines (35,5 mg Ti/kg MS) Transfert vers les feuilles
2	R20	Induction élongation racinaire (+69%) Internalisation dans les racines (73,7 mg Ti/kg MS) Transfert vers les feuilles
3	A25	Internalisation dans les racines (12,4 mg Ti/kg MS) Transfert vers les feuilles
4	R35	Internalisation dans les racines (109,3 mg Ti/kg MS)
5	A140, R700	Aucun effet

Une revue de la littérature met en évidence des propriétés très particulières pour les NPs ayant un diamètre nominal de 20-30 nm (Auffan *et al.*, 2009). Ainsi, ces NPs ont un excès d'énergie libre en surface qui augmente leur réactivité et modifie, en conséquent, leur réactivité par rapport à l'environnement. En effet, le nombre d'atomes en surface (Figure 95A) et l'énergie des NPs (Figure 95B) augmentent de façon exponentielle avec la diminution du diamètre nominal. Ces propriétés expliqueraient parfaitement nos résultats.

Dans la littérature, de nombreuses études relatent l'accumulation de NPs de diamètre inférieur à 25 nm dans les végétaux.

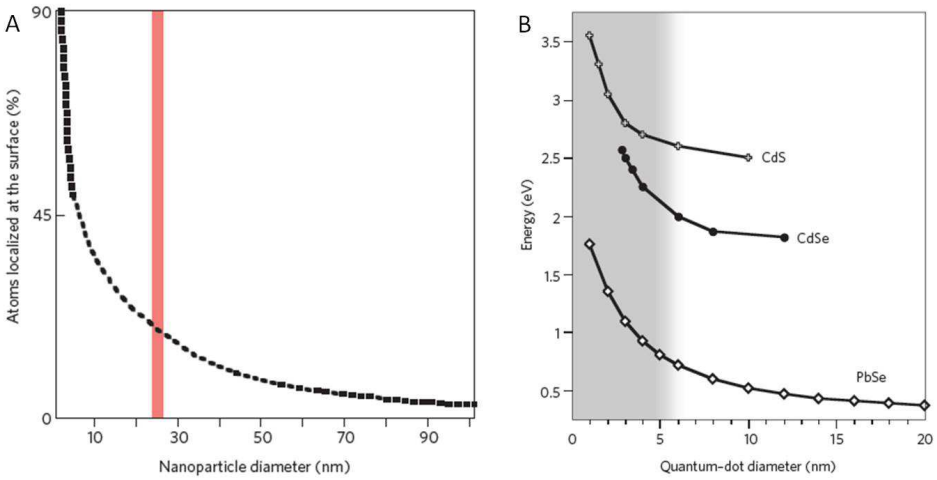


Figure 95 : A. Evolution du pourcentage d'atomes en surface en fonction du diamètre de la NP. B. Evolution de l'énergie en surface des quantum dots en fonction de leur diamètre. [Auffan et al., 2009]

Le **diamètre hydrodynamique**, quant à lui, n'est pas un paramètre physico-chimique qui permet d'expliquer l'internalisation des particules dans les racines. En effet, si l'on considère la NP R20 et la microparticule A140, elles ont un diamètre hydrodynamique équivalent (213 nm et 220 nm, respectivement). Néanmoins, on retrouve 73,7 mg Ti/kg MS dans les racines de blé exposées aux NPs R20 alors que dans les racines exposées à A140, le titane n'est pas détectable.

Des NPs présentant un diamètre hydrodynamique différent semblent néanmoins présenter une répartition racinaire différente. En effet, le titane s'accumule préférentiellement dans le parenchyme lorsque le blé est exposé à des NPs agglomérées (A12, R20 et R35). A l'inverse, lors d'une exposition à des NPs bien dispersées (A25), le titane est plus concentré dans le cylindre central. Ainsi, plus les NPs ont un diamètre hydrodynamique important, plus le titane s'accumule dans le parenchyme plutôt que dans le cylindre central. L'expérience réalisée dans le Hoagland où toutes les NPs sont agglomérées confirme ce constat.

Dans la bibliographie, lorsque des données concernant le diamètre hydrodynamique des NPs sont disponibles, on constate que les NPs se trouvent sous forme agglomérée en suspension (environ 1 µm voire plus), ce qui n'empêche visiblement pas leur internalisation (Tableau 20).

Enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'impact ou d'accumulation selon la **phase cristalline** des NPs. En effet, on note une accumulation de titane qui semble plus importante dans les racines lors d'une exposition aux NPs de phase cristalline rutile. Néanmoins, nous n'avons pas pu relier directement cette différence à la phase cristalline puisque le diamètre hydrodynamique peut également interférer dans ces observations. De plus, à diamètre nominal comparable, les NPs rutile n'entraînent pas davantage d'effets sur le développement du blé que les NPs anatase.

Dans la bibliographie, certaines études concluent que les NPs anatases sont plus réactives (Braydich-Stolle *et al.*, 2009; Falck *et al.*, 2009) alors que dans d'autres, ce sont les NPs rutiles qui présentent la plus grande réactivité (Gurr *et al.*, 2005). Cette différence de réactivité est souvent expliquée par des propriétés photocatalytiques plus prononcées pour la forme anatase. Dans notre cas, les expériences ont été réalisées dans le noir, les phénomènes de photocatalyse sont donc exclus. Deux études sur modèle cellulaire humain ont également mis en évidence une production de ROS accrue dans le noir en présence de NPs de forme rutile par rapport aux NPs de forme anatase (Braydich-Stolle *et al.*, 2009; Gurr *et al.*, 2005). Dans notre étude, aucun stress oxydant n'a pu être mis en évidence quelle que soit la NP. Cette absence de stress oxydant est peut-être due au fait que le stress ait déjà été régulé 24 h après l'exposition. Dans l'article de Gurr et al., le dosage des ROS a été effectué après 1h d'exposition.

2.5.9. Conclusion

Dans notre étude, nous avons eu l'opportunité d'accéder à des techniques d'imagerie extrêmement performantes qui nous ont permis d'obtenir des résultats originaux.

- La µ-XRF nous a permis d'obtenir des images de répartition globale du titane accumulé dans les différents compartiments racinaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences d'accumulation entre parenchyme et cylindre central selon les modalités. Ces observations permettent notamment d'avancer sur des hypothèses de mécanismes d'internalisation et d'action des NPs qui restent très peu élucidés à ce jour. Ces données relatives à la distribution des NPs dans les tissus végétaux n'existent pas, pour le moment, dans la bibliographie.

- La quantification par µ-PIXE/RBS est particulièrement intéressante dans notre cas. En effet, ce type de technique, en plus de donner des informations de répartition, nous permet de nous affranchir du

titane adsorbé sur les racines lors de nos dosages. Peu de techniques permettent l'accès à de telles informations (LA-ICP-MS, PIXE). Dans la littérature, les dosages sont réalisés principalement par ICP-AES ou ICP-MS, ce sont donc des dosages globaux effectués sur des lysats de racine entière, qui incluent aussi bien l'élément adsorbé que celui qui est absorbé.

- L'analyse *in situ* de la coordination du titane par XAS à partir des cartographies µ-XRF est un réel avantage. En général, cette analyse est réalisée sur des pastilles de plantes. Ces pastilles sont réalisées en broyant les végétaux et en les compactant. Ainsi, la pastille contient à la fois le métal internalisé et celui adsorbé à la surface, pouvant ainsi biaiser l'analyse. En effet, le métal adsorbé prédomine souvent en quantité sur le métal absorbé. Le spectre résultant est donc celui du métal adsorbé à la surface de la plante plus que celui du métal absorbé dans la plante.

Enfin, cette partie de notre étude a permis de mettre en évidence plusieurs faits :

- **Internalisation dans les racines de blé des NPs ≤ 35 nm**
- **Transfert dans les feuilles de blé des NPs ≤ 25nm**
- **Induction de l'élongation racinaire pour des NPs ≤ 20 nm**

Le diamètre nominal est donc un paramètre primordial dans l'étude du devenir des NPs de TiO_2 dans les végétaux. Le diamètre hydrodynamique module la répartition des NPs dans la plante : des NP agglomérées sont accumulées dans les racines mais n'atteignent pas le cylindre central et ne sont donc pas transférées vers les feuilles. Quant à la phase cristalline, aucun lien n'a pu être dégagé de façon formelle entre cette caractéristique et l'internalisation ou l'impact des NPs sur le développement du blé.

3. Influence de l'espèce végétale sur l'accumulation et la phytotoxicité des NPs de TiO_2

D'après la bibliographie, le devenir des NPs dans les végétaux est en partie lié à l'espèce végétale considérée. Pour étudier cet aspect, l'analyse de l'accumulation et de la phytotoxicité des NPs de TiO_2 a également été menée sur le colza en hydroponie. Le colza est une dicotylédone, contrairement au blé qui appartient à la famille des monocotylédones. Cette étude comparée nous permettra de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement de ces deux grandes familles de végétaux face à une contamination de leur environnement aux NPs.

De plus, l'accumulation de titane dans le colza a également été évaluée lors d'une exposition foliaire simulant une contamination aérienne de cultures agricoles.

Ces résultats font l'objet d'une publication dans Journal of Environmental Health (Annexe 6).

3.1. Exposition racinaire du colza aux NPs de TiO_2

3.1.1. Quantification du titane dans les racines de colza

Les expériences sur le colza ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles sur le blé. Ainsi, de jeunes plantules de colza de 15 jours ont été exposées par les racines pendant une semaine à des suspensions de NPs A12 et A25 à 100 mg/L. La quantification du titane dans les coupes de racine de colza a été réalisée par µ-PIXE/RBS (Figure 96).

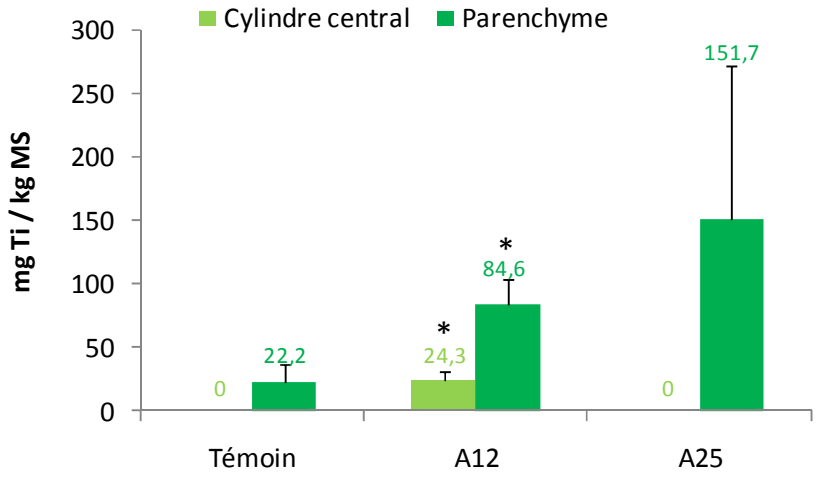


Figure 96 : Quantification du titane dans le cylindre central et dans le parenchyme de racines de colza exposées en hydroponie à 100 mg/L de deux différentes suspensions de NPs de TiO_2. *(* p≤0,05 par rapport au témoin*)

Ces résultats mettent en évidence une internalisation du titane dans les racines de colza lors d'une exposition à des NPs A12 avec une concentration de 84,6 mg Ti/kg MS dans le parenchyme. La teneur en titane dans la racine de colza exposée à une suspension de A25 est également élevée : 151,7 mg Ti/kg MS. Néanmoins, cette mesure est sujette à une forte variabilité, elle est donc à considérer avec précautions.

Si l'on compare les résultats d'accumulation obtenus sur le blé et sur le colza, il semble que le colza accumule le titane en plus grandes proportions que le blé. Par exemple, sur deux plantules exposées à A12, le titane s'accumule dans le parenchyme du blé à hauteur de 35,5 mg Ti/kg MS alors que dans le colza la concentration s'élève jusqu'à 84,6 mg Ti/kg MS.

3.1.2. Distribution du titane dans les tissus végétaux du colza

Nous avons étudié la répartition du titane dans les racines de colza exposées à une suspension de NPs A25 à 100 mg/L par µ-XRF (Figure 97).

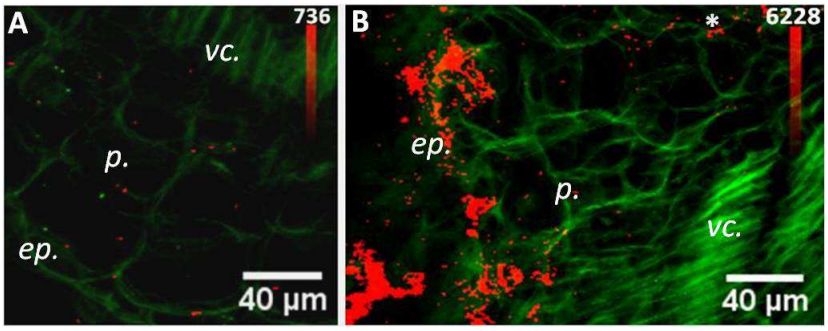


Figure 97 : Cartographie en µ-XRF de la répartition du titane dans des racines de colza cultivées en hydroponie. A. Racine témoin cultivée dans de l'eau ultrapure. B. Racine exposée à 100 mg/L de TiO_2 A25. En vert, la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge, la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). *, point le plus concentré en titane à l'intérieur de la racine (B : 4182 cps). Les images A et B ont été enregistrées sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm². (*ep. épiderme, p. parenchyme, vc. cylindre central*)

La cartographie de la racine de colza témoin cultivée dans l'eau ultrapure fait apparaitre un niveau basal en titane de 736 cps/pt (Figure 97A). En comparaison, la racine exposée aux NPs A25 a un niveau maximum de 4182 cps/pt dans le parenchyme (Figure 97B). Le titane est donc détecté en grande quantité dans le parenchyme. Néanmoins, il n'est pas détecté dans le cylindre central. Cette analyse vient ainsi confirmer les dosages en µ-PIXE/RBS. En conséquent, l'analyse des feuilles de colza a également été réalisée pour identifier un éventuel transfert des NPs vers les parties aériennes (Figure 98).

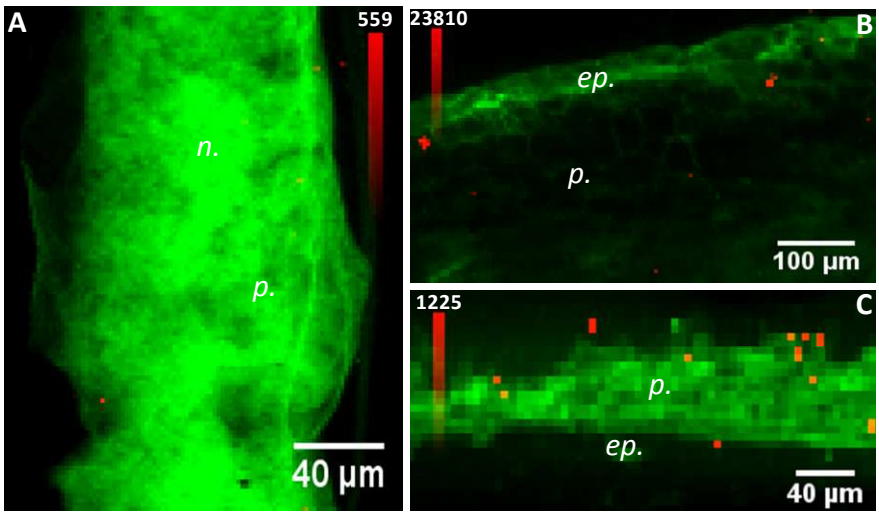


Figure 98 : Cartographie par µ-XRF de la répartition du titane dans les feuilles de colza. A. Feuille témoin d'une plantule cultivée dans l'eau ultrapure. Feuilles de plantules de colza exposées en hydroponie à 100 mg/L de NPs de TiO_2 A12 (B) ou A25 (C). En vert, la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). L'image A a été enregistrée sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm², les images B et C ont été enregistrées sur la ligne LUCIA avec une résolution de 5 x 5 µm². (*p. parenchyme, n. nervure*)

La feuille de colza témoin affiche un maximum de 559 cps/pt (Figure 98A). En comparaison, les feuilles de plantules exposées à A12 et A25 ont un nombre de coups par point maximum qui s'élève respectivement à 23810 (Figure 98B) et 1225 (Figure 98C). On constate donc que ces NPs sont transférées vers les feuilles. Le nombre de coups obtenu dans la feuille de blé et dans la feuille de

colza exposée à A25 est équivalent (1536 cps/pt pour le blé et 1225 cps/pt pour le colza). Néanmoins, la quantité de titane détectée dans la feuille de colza après exposition à A12 est extrêmement élevée, près de 5 fois plus importante que dans le blé.

Ainsi, les NPs sont davantage internalisées dans le colza mais également davantage transférées vers les feuilles.

3.1.3. Impact des NPs de TiO_2 sur le développement du colza

En parallèle à la détermination de l'accumulation du titane dans les tissus végétaux, l'impact des NPs sur le développement du colza a été étudié. Sur le colza, les tests de germination, d'élongation racinaire, de biomasse et d'ETP ont été menés de front par exposition à des NPs en suspension dans l'eau ultrapure (Figure 99) et dans le Hoagland (Figure 100). Ces deux modalités vont permettre d'identifier une éventuelle influence du diamètre hydrodynamique des NPs sur le développement du colza.

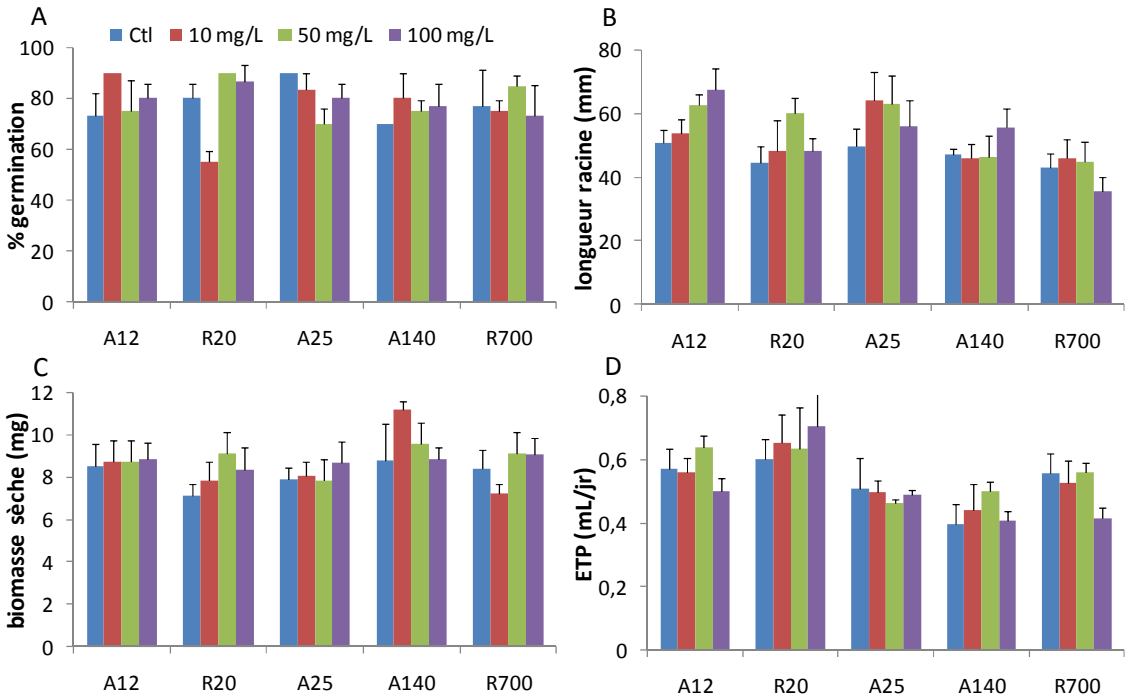


Figure 99 : Impact de NPs de TiO_2 en suspension dans l'eau ultrapure sur le développement du colza en hydroponie. A. Taux de germination. B. Longueur des racines. C. Biomasse sèche. D. Evapotranspiration

Nous n'avons pas observé de modulation du taux de germination (Figure 99A), de la biomasse sèche (Figure 99C) et de l'ETP (Figure 99D) du colza suite à une exposition aux NPs préparées dans de l'eau ultrapure. En ce qui concerne l'élongation racinaire (Figure 99B), aucune différence significative n'a pu être dégagée. Néanmoins, des tendances à l'induction de l'élongation racinaire sont visibles lors d'exposition à A12, R20 et A25 avec des augmentations de l'ordre de 30%.

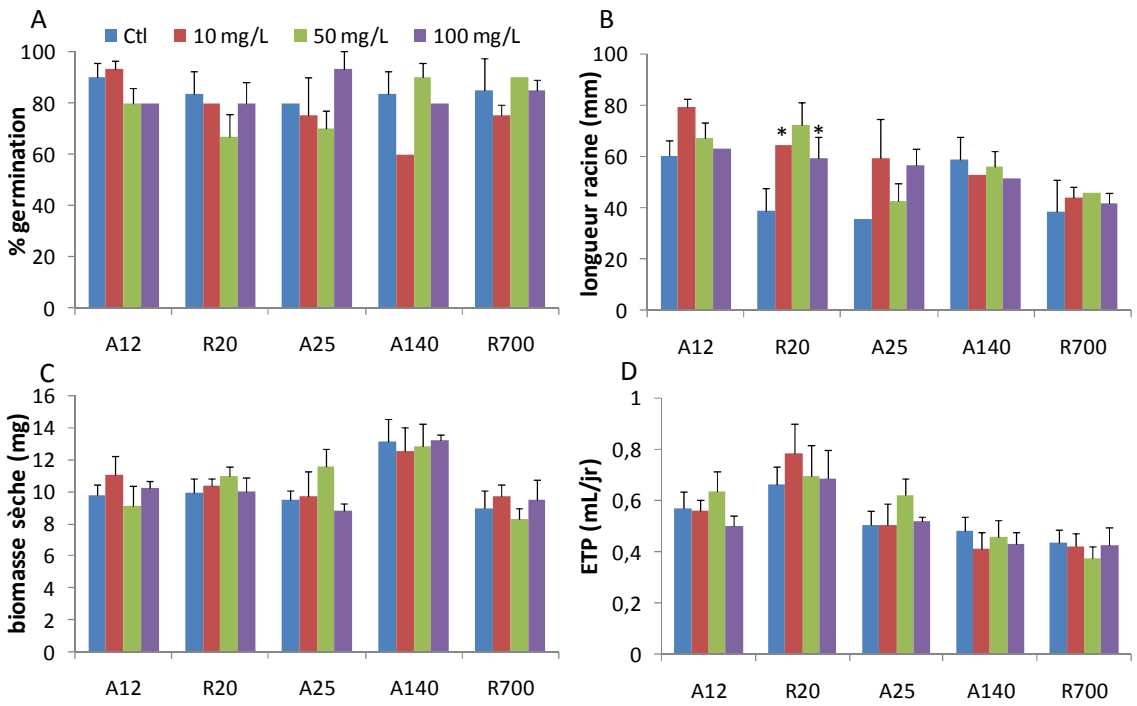


Figure 100 : Impact de NPs de TiO_2 en suspension dans du Hoagland sur le développement du colza en hydroponie. A. Taux de germination. B. Longueur des racines. C. Biomasse sèche. D. Evapotranspiration

Lorsque l'exposition a lieu dans du Hoagland, comme dans l'eau ultrapure, Il n'y a pas d'effets visibles sur le taux de germination (Figure 100A), sur la biomasse sèche (Figure 100C) et sur l'ETP (Figure 100D). Le seul critère sensible à la présence de NPs dans le milieu d'exposition est la longueur des racines (Figure 100B). Ainsi, lors d'une exposition à R20, les racines sont plus longues d'environ 80%. Lors d'une exposition à A12, on note seulement une tendance à une augmentation de l'élongation racinaire (+31% à 10 mg/L).

Il semble donc qu'une exposition aux NPs en suspension dans du Hoagland entraîne une augmentation de la sensibilité des végétaux avec une induction de l'élongation racinaire significative. Une hypothèse justifiant la différence d'induction racinaire après exposition dans de l'eau ultrapure ou dans du Hoagland est la suivante : dans les deux cas, les NPs présentes en suspension sont à l'origine de nouveaux pores dans les racines, ces pores permettant une nutrition hydrominérale plus efficace. Lors d'une exposition dans l'eau ultrapure, seul un flux hydrique plus important est possible alors que lors d'une exposition dans du Hoagland, des nutriments sont également internalisés par ces nouveaux pores expliquant ainsi une induction racinaire plus importante.

3.2. Influence de la voie d'exposition : exposition aérienne du colza à des NPs de TiO_2

Le cas d'une contamination aérienne aux NPs a également été envisagé. Ainsi, une feuille de plantule de colza a été trempée dans une suspension de NPs A12 à 100 mg/L. Après une semaine, l'accumulation du titane a été étudiée par µ-XRF à la fois dans la feuille exposée mais également dans la feuille étant apparue pendant le temps de l'exposition pour mettre en évidence un éventuel transfert des NPs vers d'autres parties du végétal.

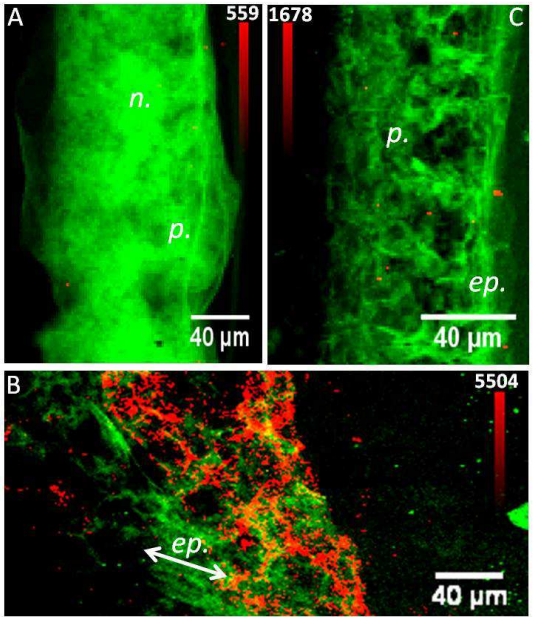


Figure 101 : Cartographie par µ-XRF de la répartition du titane (A12) dans les feuilles de colza après une exposition par voie aérienne. A. Feuille témoin non exposée. B. Feuille exposée à 100 mg/L de A12. C. Feuille néoformée lors de l'exposition. En vert, la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups). Les trois images ont été enregistrées sur la ligne ID21 avec une résolution de 1 x 1 µm². *(ep. épiderme, p. parenchyme, n. nervure)*

Le bruit de fond en titane dans la feuille non-exposée s'élève à 559 cps/pt (Figure 101A). Dans la feuille exposée, la concentration est beaucoup plus élevée : jusqu'à 5504 cps/pt. Le titane est détecté dans la totalité de la coupe de la feuille sans répartition préférentielle (Figure 101B). Ainsi, le titane des NPs A12 a pénétré dans la feuille exposée en grande quantité soit par les stomates soit en traversant la cuticule et l'épiderme. Enfin, l'étude de la feuille néoformée montre que ce titane est mobilisable et qu'il a ainsi été transféré vers une feuille en formation (Figure 101C). On détecte des points fortement concentrés en titane (1678 cps/pt). Si la possibilité d'une contamination de la coupe avec du titane exogène est envisageable dans le cas de la feuille exposée, cette pollution est exclue dans le cas de la feuille néoformée. En effet, cette feuille n'a pas été directement exposée et a été coupée avant la feuille exposée pour éviter ce type de pollution.

Cette analyse en µ-XRF prouve donc qu'une contamination aérienne aurait également pour conséquence une accumulation de titane dans le colza. Ces résultats doivent toutefois être confirmés car la mesure n'a été réalisée qu'une fois.

3.3. Discussion des résultats

3.3.1. Influence de l'espèce végétale sur l'accumulation et la phytotoxicité des NPs

Les résultats obtenus sur le blé et sur le colza, c'est-à-dire sur une monocotylédone et une dicotylédone, montrent un comportement similaire de ces deux espèces végétales. Les NPs de TiO_2 sont internalisées par les racines et transférées vers les feuilles. Les plus petites NPs induisent de la même façon l'élongation racinaire sur les deux plantes. Il ne semble donc pas y avoir de différences

majeures entre ces deux espèces. Néanmoins, le colza semble accumuler le titane en plus grande quantité dans ses tissus que le blé.

Une étude récente a été menée sur la toxicité et l'accumulation de l'uranium dans plusieurs plantes dont le blé et le colza. Les résultats montrent, comme dans notre cas, que le colza présente une accumulation plus importante (2800 ppm) que le blé (350 ppm) (Laurette, 2011).

Le colza est une plante bien connu en phytoremédiation pour ses propriétés d'hyperaccumulatrices des métaux comme l'argent, le chrome, le mercure, le plomb, le sélénium ou encore le zinc (McCutcheon and Schnoor, 2003). Ces propriétés peuvent expliquer, en partie, le fait que le colza accumule le titane en plus grande quantité que le blé.

Des différences d'impact des NPs selon l'espèce végétale ont déjà été mises en évidence à plusieurs reprises et sur plusieurs aspects : internalisation, dissolution des NPs dans les tissus végétaux ou encore impact sur le développement.
Les techniques de localisation des NPs étant assez lourdes à mettre en œuvre, il existe à ce jour peu d'études comparatives concernant les espèces végétales. L'une d'entre elles a notamment montré que des NPs de Fe_3O_4 (20 nm) étaient internalisées dans les racines de citrouille alors qu'elles ne l'étaient pas dans les racines de haricot (Zhu *et al.*, 2008). Une expérience menée sur 4 espèces végétales a illustré le fait que des NPs de CeO_2 (7 nm) étaient internalisées dans les racines de toutes ces plantes. Néanmoins, la quantité accumulée différait selon le classement suivant maïs<concombre<tomate<luzerne. Dans ce classement, l'espèce qui accumule le moins appartient à la famille des monocotylédones, comme le blé (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b).

A ce jour, il est impossible de conclure à une différence d'accumulation selon l'appartenance du végétal à la famille des mono- ou des dicotylédones. Il serait intéressant de mener un criblage plus large pour voir si cette hypothèse peut être confirmée ou au contraire infirmée.

L'espèce végétale peut aussi influer sur la spéciation des NPs dans les tissus. Ainsi, le ray-grass après une exposition à des NPs de Fe_3O_4 présente une internalisation de Fe sous forme de NPs alors que la citrouille présente du Fe sous forme oxydée (Wang *et al.*, 2011a). A l'inverse, les NPs de CeO_2, qui sont connues pour être inertes, ne voient pas leur structure modifiée dans les racines quelles que soient les espèces végétales (maïs, concombre, tomate ou luzerne) (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b).
Dans ce cas, l'étude des exsudats racinaires des végétaux ainsi que de leur arsenal enzymatique de dépollution pourrait apporter des indices pour expliquer les différences constatées.

Si l'accumulation a été peu étudiée, la différence de sensibilité aux NPs selon les espèces végétales a fait l'objet de plusieurs articles concernant majoritairement le développement des plantes. Globalement, il apparait qu'une même NP a des effets très divers selon les espèces et les tests considérés (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Lin and Xing, 2007; Lee *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2010b; Yang and Watts, 2005).

Ainsi, si on s'intéresse uniquement à l'élongation racinaire, les NPs de CeO_2 sont à l'origine d'une induction pour le soja, le concombre et le maïs mais d'une inhibition pour la tomate et le ray-grass. Si, on considère maintenant différents tests : une exposition aux NPs CeO_2 diminuera la germination du concombre et du maïs mais augmentera la longueur des racines et des tiges de ces mêmes plantes (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b).

L'étude comparative de tous les articles sur ce sujet ne permet de mettre en évidence aucun comportement propre à une famille (monocotylédone Vs dicotylédone).

Dans certains cas, les monocotylédones sont plus sensibles. Après une exposition à des NPs à base de zinc, seule la germination du maïs et du ray-grass est impactée alors que celle du radis, du colza, de la laitue et du concombre n'est pas modifiée (Lin and Xing, 2007). Lorsque les auteurs s'intéressent ensuite à l'élongation racinaire, ils obtiennent une diminution pour toutes les espèces exposées aux NPs de Zn et de ZnO. Mais les deux monocotylédones sont les seules à être sensibles aux NPs Al_2O_3, Al et aux MWCNTs. Le blé apparait également plus sensible que le haricot à une exposition à des NPs de Cu puisque son EC_{50} est de 335 mg/L contre 570 mg/L pour le haricot (Lee *et al.*, 2008).

A l'inverse, le colza est plus sensible (diminution plus prononcée de l'élongation racinaire) que le blé lors d'exposition à des NPs de La_2O_3, Gd_2O_3 et Yb_2O_3 (Ma *et al.*, 2010b). Le colza réagit également aux faibles concentrations de NPs de La_2O_3 et de Yb_2O_3 par un effet d'hormesis, absent chez le blé.

En conclusion, les espèces végétales répondent différemment à une contamination de leur milieu en NPs mais aucune règle générale ne peut être tirée à ce jour.

3.3.2. Influence de la voie d'exposition sur l'accumulation des NPs

Nos précédentes expériences ont prouvé que les NPs de TiO_2 étaient internalisées dans les racines du blé et du colza puis transférées vers les parties aériennes lors d'une exposition par voie racinaire. Ce type d'exposition mime une contamination du sol et/ou de la solution de sol des végétaux. Cette pollution est susceptible de se produire lors d'épandage de boues de station d'épuration sur des sols cultivés (Gottschalk *et al.*, 2009) ou lors d'irrigations avec une eau contaminée.

Un deuxième type de contamination existe, c'est la contamination atmosphérique. Il y a alors deux types de contact envisageables entre l'atmosphère pollué et la plante : un dépôt sec de NPs ou un dépôt humide à l'occasion d'un épisode pluvieux. L'épisode sec peut être simulé à l'aide d'un aérosol de NPs. La génération d'un tel aérosol présente des risques évidents de sécurité. Ainsi, nous nous sommes plutôt focalisés sur un dépôt de type humide, en plongeant une feuille dans une suspension de NPs.

Actuellement, il existe seulement deux articles relatant des résultats issus d'expériences réalisées suite à une contamination aérienne (Birbaum *et al.*, 2010; Eichert *et al.*, 2008). L'étude de Birbaum et al. a été réalisée par génération d'un aérosol de NPs de CeO_2 dans un système de boîte à gants (c'est-à-dire, hermétiquement clos) sur des plantules de maïs (Birbaum *et al.*, 2010). Les NPs ont un diamètre nominal moyen de 37 nm. Le cérium est ensuite dosé par ICP-MS dans les feuilles ayant subi l'exposition et celles apparues après l'exposition. Du cérium a ainsi été détecté dans les feuilles exposées. Néanmoins, les auteurs ne peuvent différencier le cérium déposé sur les feuilles de celui qui serait éventuellement internalisé. Les feuilles néoformées après l'exposition ne contiennent pas de cérium. Ainsi, il semble que ces NPs de CeO_2 ne soient pas transférées dans la plante.

La deuxième étude avait pour but d'étudier le fonctionnement des stomates. Pour cela, les auteurs ont déposé sur des feuilles de fève (*Vicia faba*) des gouttelettes de NPs de polystyrène de deux diamètres nominaux différents (43 nm et 1,1 µm). Ces NPs ont la propriété d'être

fluorescentes ; leur pénétration a donc été étudiée par microscopie confocale à balayage laser. Les auteurs ont conclu que les NPs de 43 nm de diamètre étaient internalisées dans les feuilles en passant par les stomates alors que les microparticules ne pénétraient pas. L'ouverture des stomates est de l'ordre de plusieurs microns. Cette étude prouve donc qu'il existe au niveau des feuilles une voie d'absorption régulée (Eichert *et al.*, 2008).

Ces deux articles laissent penser que l'impact d'une contamination aux NPs par voie foliaire dépendra de la **nature du dépôt** : sec ou humide. Lors d'un dépôt sec, les NPs de CeO_2 de 37 nm (diamètre NPs<diamètre stomate) ne sont pas internalisées alors que des NPs de polystyrène et de TiO_2 seraient internalisées lors d'une contamination par dépôt humide.

4. Influence du substrat sur l'accumulation de NPs de TiO_2 dans le blé

Après avoir étudié l'internalisation de NPs de TiO_2 dans un milieu très simple (eau ultrapure) et dans un milieu légèrement complexifié (milieu nutritif de Hoagland), nous avons mené une analyse sur des plantules de blé poussant sur différents types de sols naturels, que nous avons volontairement contaminés.

Le but de toute recherche en écotoxicologie est de prédire ce qu'il adviendrait de polluants dans l'environnement. Ainsi, même si l'étape d'analyse en milieu simple est indispensable en première approche, il est important de se rapprocher de milieux environnementaux.

Pour mener à bien cet objectif, nous avons employé 4 sols présentant des caractéristiques différentes, et précisément caractérisés (sols standard Lufa Speyer). Les expériences ont été réalisées à l'aide du montage expérimental présenté en Figure 102. 15 g de chaque type de sol et 15 mL d'eau ultrapure avec (100 mg/L) ou sans NPs A25 ont été mis en contact dans un tube et agités pendant 48 h. Ensuite, le tout a été versé dans le corps d'une seringue dont le trou a été recouvert d'un coton humidifié. Le sol est laissé à ressuyer pendant 48 h, puis une graine de blé est mise à germer par tube.

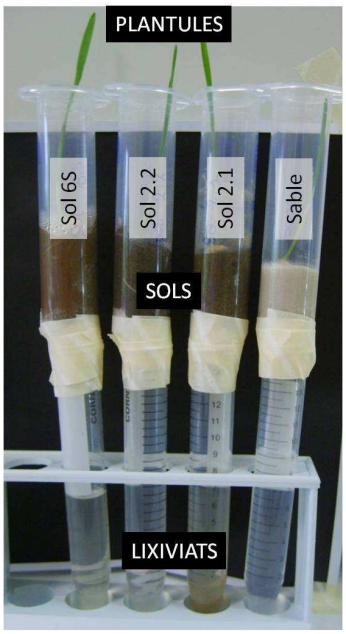


Figure 102 : Montage expérimental pour étudier le comportement des NPs A25 dans un système sol/blé

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés au devenir des NPs aussi bien dans les sols que dans les végétaux. Nous avons ainsi dosé le titane par ICP-MS dans les sols et les lixiviats. Nous avons également quantifié et localisé le titane dans les racines de blé par µ-PIXE/RBS et µ-XRF. Enfin, comme la plupart des sols naturels contiennent du titane, et que celui-ci est majoritairement sous forme cristalline rutile (Greenwood and Earnshaw, 1984), nous avons analysé la phase cristalline du titane internalisé dans les plantes par XAS de façon à déterminer son origine.

4.1. Devenir des NPs de TiO_2 dans différents sols

4.1.1. Mise au point expérimentale pour le dosage par ICP-MS des NPs

L'étape de minéralisation des échantillons, préalable au dosage par ICP-MS, a fait l'objet d'une optimisation car il convient de solubiliser totalement les NPs. Un protocole préalablement établi au laboratoire a été appliqué à 100 µg/L de NPs de TiO_2 (Mariet *et al.*, 2008) : attaque à l'acide nitrique seul (HNO_3), classiquement employée pour les minéralisations ou avec ajout de fluorure d'ammonium (NH_4F) ou d'acide fluorhydrique (HF) pour dissoudre les oxydes. Les résultats montrent que l'ajout de NH_4F donne un rendement de minéralisation de près de 100% et que l'acide nitrique seul est insuffisant à minéraliser les NPs (Tableau 23). De plus, le HF a été éliminé pour des raisons de sécurité.

Tableau 23 : Rendement de minéralisation de 100 µg/L de NPs de TiO_2 selon le réactif utilisé lors de l'étape de minéralisation

HNO_3	seul	+ NH_4F	+ HF
Moyenne (µg/L)	17,5	97	64,5
Ecart-type (µg/L)	4	1	1

Deux autres tests ont été réalisés pour s'assurer de la robustesse du protocole opératoire. Le premier a consisté à vérifier que la minéralisation des NPs s'effectuait bien quelle que soit la concentration et qu'il n'existait pas un effet seuil et une concentration à partir de laquelle la minéralisation était moins efficace. Pour cela des concentrations de NPs de TiO_2 allant de 0 à 100 µg/L ont été minéralisées par l'attaque au HNO_3 et NH_4F précédemment décrite (Figure 103A). Le deuxième test a permis de s'assurer que la quantité de titane ne diminuait pas entre la minéralisation et le dosage par ICP-MS (par exemple adsorption sur les parois du tube). Ainsi, des dosages ont été réalisés entre 5 jours et 25 jours après la minéralisation (Figure 103B).

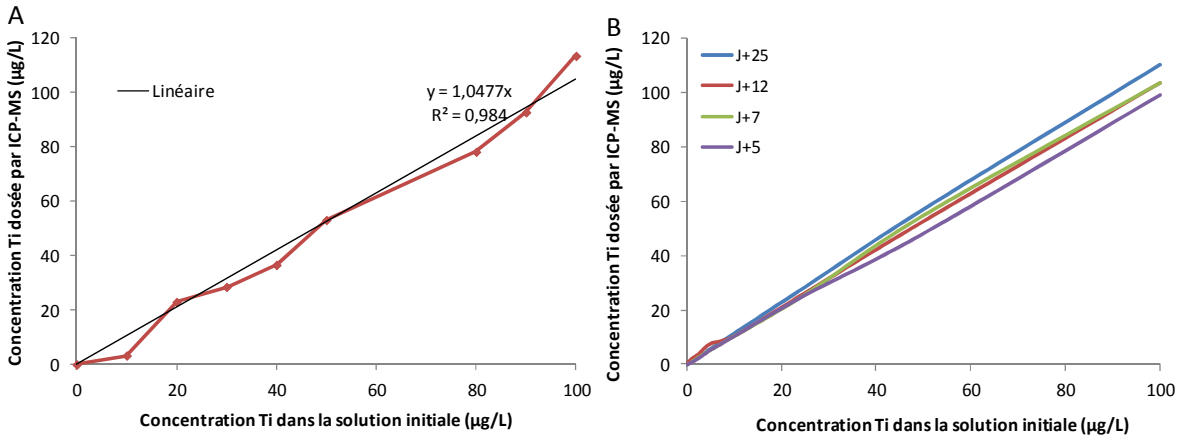


Figure 103: A. Evaluation de l'influence de la concentration initiale en Ti sur l'efficacité de la minéralisation. B. Influence de la durée entre la minéralisation et le dosage sur la concentration en Ti.

Ces deux expériences montrent que la minéralisation des NPs de TiO_2 est efficace jusqu'à une concentration d'au moins 100 µg/L et qu'il n'y a pas de perte de Ti dans les tubes entre la mise en solution des échantillons et leur dosage.

4.1.2. Dosage du titane dans les sols et les lixiviats

Les sols étudiés diffèrent surtout pas leur granulométrie. Ainsi, la proportion de particules de taille <0,063 mm est respectivement de 0%, 13,7%, 19,2% et 78,9% pour le sable (sable), le sable limoneux (sol 2.1), le sable loameux (sol 2.2) et le loam argileux (sol 6S). La capacité d'échange cationique (CEC), quant à elle, est de 4, 6 et 7 meq/100 g pour le sable limoneux, le sable loameux et le loam argileux.

La teneur en titane dans ces sols naturels varie fortement d'un type de sol à l'autre. Ainsi, plus le sol est riche en argile (fraction du sol dont le diamètre est <4 µm), plus sa concentration en titane augmente.

Les résultats obtenus lors du dosage par ICP-MS (Tableau 24) montrent que la teneur en titane dans les sols peut beaucoup varier avec des teneurs allant de 78 à 3577 mg Ti/kg dans notre cas. On obtient le classement suivant pour la teneur en titane : sable < sable limoneux (sol 2.1) ≈ sable loameux (sol 2.2) < loam argileux (sol 6S). La teneur en titane du loam argileux (sol 6S) est 36 fois plus élevée que celle du sable. Les sables limoneux (sol 2.1) et loameux (sol 2.2) ont une teneur intermédiaire ; ils contiennent 8 fois plus de titane que le sable.

Tableau 24 : Teneur en titane des différents sols naturels et artificiellement contaminés.

Teneur en Ti (mg/kg)	Sable	Sable limoneux	Sable loameux	Loam argileux
Dans les sols naturels	78 ± 52	616 ± 108	890 ± 121	3577 ± 372
Dans les sols contaminés	220 ± 81	1220 ± 297	927 ± 138	3353 ± 26

La quantité de lixiviat en sortie des tubes ainsi que leur teneur en titane ont également été mesurées (Figure 104).

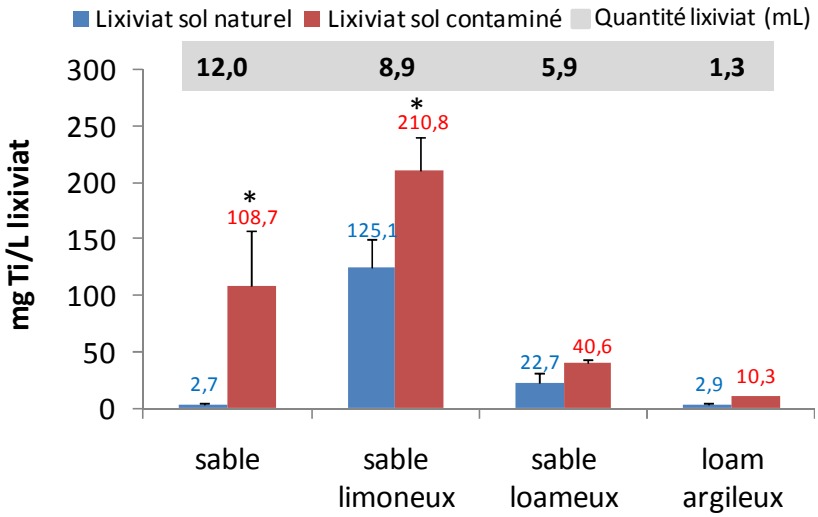


Figure 104 : Evaluation de la quantité de lixiviat par type de sol et dosage par ICP-MS du titane contenu dans ces lixiviats (mg Ti/L). Les sols testés sont soit des sols naturels, soit des sols volontairement contaminés (100 mg/kg TiO_2 A25). *(*p<0,05 entre lixiviat sur sol naturel et lixiviat sur sol contaminé)*

La quantité de lixiviats récupérée en sortie de tubes varie en fonction de la teneur en argile du sol. Ainsi, dans un échantillon de sable la quasi-totalité de l'eau ajoutée va percoler (12 mL) alors que dans un loam argileux (sol 6S), au contraire, l'eau reste dans le sol (1,3 mL lixivié).

On constate également que le titane est plus ou moins lié aux particules du sol. Ainsi, le sable qui a une concentration en titane très inférieure à celle du loam argileux contient malgré tout 8 fois plus de titane dans son lixiviat (32 µg contre 4 µg). Ramené en concentrations, les lixiviats du sable et du loam argileux contiennent la même quantité de titane (2,7 et 2,9 mg Ti/L lixiviat respectivement).

Ces observations sont confirmées par l'étude des lixiviats des sols contaminés. La quantité de titane dans le sable passe de 32 µg à 1305 µg (volume égal). Dans le loam argileux, la quantité de titane ne change pas significativement.

En ce qui concerne les sables limoneux et loameux, leur comportement par rapport à la lixiviation diffère. Ainsi, le sable loameux se rapproche du comportement du loam argileux avec une concentration en titane dans le lixiviat de 23 mg Ti/L et une augmentation non significative dans le cas d'un sol contaminé. A l'inverse, le sable limoneux a un comportement plus proche du sable avec une plus forte lixiviation et une concentration en titane dans les lixiviats accrue lors d'une contamination. Ce sol étant initialement plus riche en titane, le lixiviat en sortie est également beaucoup plus concentré (125 mg Ti/L).

Face à la contamination des sols testés, deux catégories de comportement apparaissent. Dans le sable et le sable limoneux (sol 2.1), les lixiviats s'enrichissent en titane. Dans le sable loameux (sol 2.2) et le loam argileux (sol 6S), la quantité de titane dans les lixiviats reste inchangée suggérant que la totalité des NPs apportées volontairement est retenue dans le sol.

Ces résultats ont 2 implications majeures lors d'une contamination :

- le sable contiendra moins de titane que le loam argileux
- le titane sera, *a priori*, moins fortement lié aux particules du sol dans le sable que dans le loam argileux

En résumé, le sable contiendra donc moins de titane, mais il sera plus biodisponible que dans le loam argileux.

4.2. Quantification du titane dans les racines de blé cultivé sur sols

La quantité de titane dans les racines des plantules de blé germées et cultivées sur ces sols pendant trois semaines a été évaluée par µ-PIXE/RBS (Figure 105). Ces mesures n'ont été réalisées que sur deux types de sol : le sable loameux et le loam argileux, c'est-à-dire sur les sols les plus riches en titane naturel mais également ceux qui ont retenu le plus de NPs lors de la contamination.

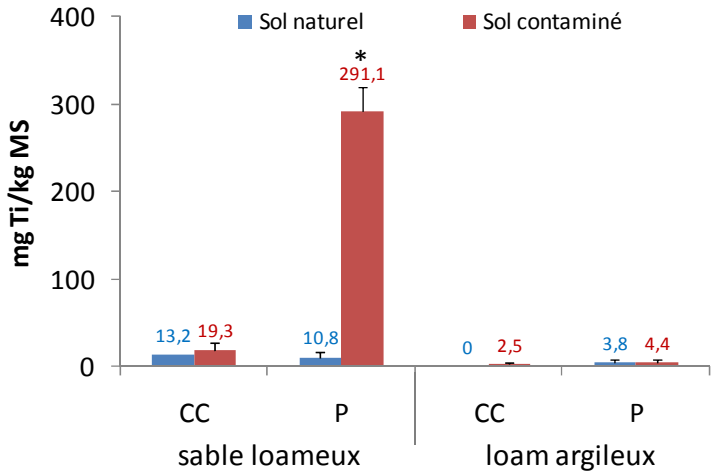


Figure 105 : Quantification du titane dans les racines de blé cultivées sur deux sols naturels ou artificiellement contaminés (100 mg TiO_2/kg). ***(CC. cylindre central, P. parenchyme) (*p<0,05 entre sol naturel et sol contaminé)***

Le dosage du titane dans les racines montre que le blé cultivé sur le sable loameux que nous n'avons pas contaminé contient plus de titane (≈ 12 mg Ti/kg MS) que le blé cultivé sur le loam argileux (≈ 1,9 mg Ti/kg MS) alors que ce dernier type de sol est beaucoup plus riche en titane.

Sur les sols artificiellement contaminés, la quantité de titane dans le parenchyme de racine cultivée dans le sable loameux a fortement augmenté (jusqu'à 291 mg Ti/kg MS) ; ce n'est pas le cas dans le cylindre central des plantules cultivées sur ce même sol. En revanche il n'y a pas de différence significative du contenu en titane dans la racine cultivée dans le loam argileux contaminé.

Ces résultats prouvent que le titane dans les sols argileux, que ce soit le titane géogénique ou le titane provenant des NPs volontairement ajoutées au sol, est très peu biodisponible pour le blé. Par contre, dans un sol comme un sable loameux, une contamination aux NPs mène à une accumulation en titane dans les racines multipliée par 27.

4.3. Répartition du titane dans les racines de blés cultivés sur sols

Nous avons également analysé par µ-XRF la répartition du titane dans les racines de plantules de blé ayant germées et poussées sur ces différents sols naturels ou artificiellement contaminés (Figure 106). Pour chacun des quatre types de sol, les analyses ont été réalisées à la fois sur des racines ayant poussé sur des sols naturels (Figure 106A-D) et sur des racines ayant poussé sur des sols artificiellement contaminés (Figure 106E-H).

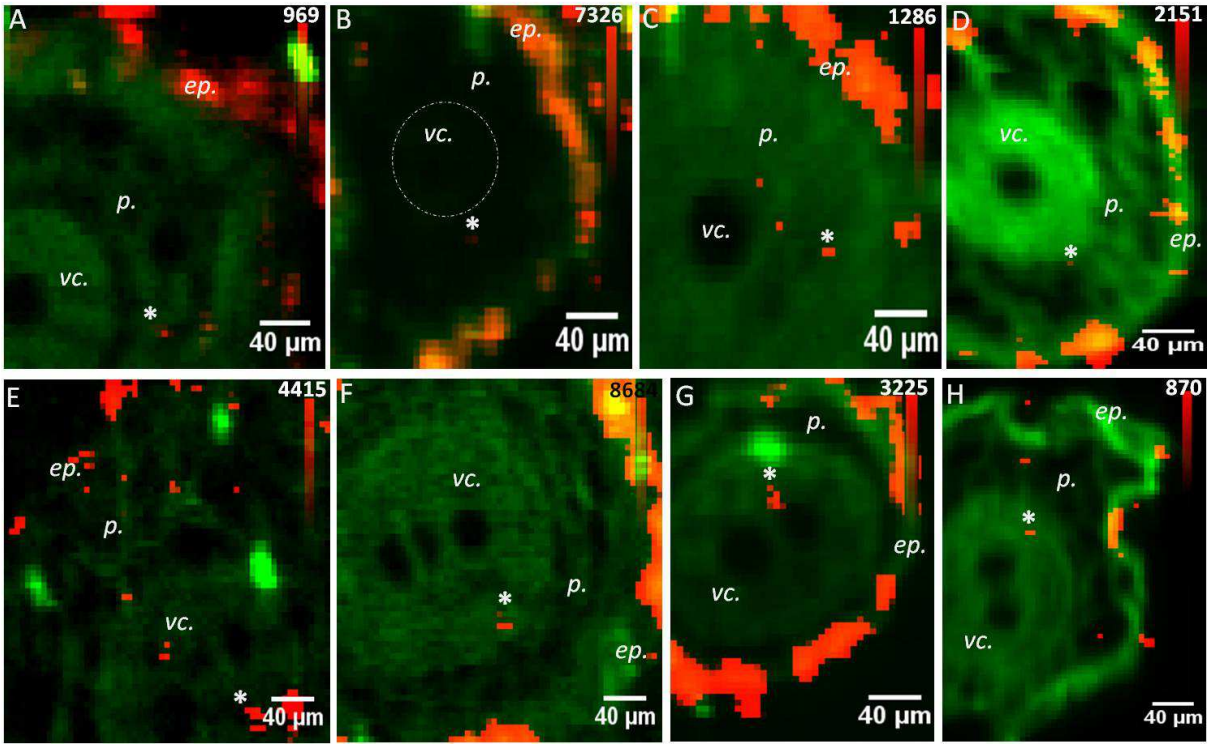


Figure 106 : Cartographie en µXRF de la répartition du titane dans les racines de blés cultivés dans différents types de sols naturels (A-F) ou artificiellement contaminés à 100 mg/kg NPs A25 (E-H). A et E sur sable. B et F sur sable limoneux. C et G sur sable loameux. F et H sur loam argileux. En vert la cartographie de la répartition du potassium retrace les tissus végétaux et en rouge la cartographie de la répartition du titane avec son échelle d'intensité (en nombre de coups,). *, point le plus concentré en titane dans la racine (A : 240 cps, B : 724 cps, C : 119 cps, D : 127 cps, E : 4415 cps, F : 1462 cps, G : 526 cps, H : 298 cps) (*ep. épiderme, p. parenchyme, vc. cylindre central*). Toutes les images ont été enregistrées sur la ligne LUCIA avec une résolution de 5 x 5 µm².

Sur toutes ces cartographies, le titane est principalement détecté adsorbé sur l'épiderme ainsi qu'en moindre quantité dans le parenchyme et le cylindre central des racines, sans répartition préférentielle.

Les analyses en µ-XRF ne sont pas quantitatives. Dans cette étude, nous nous sommes appuyés sur le nombre de coups maximum sur les coupes de racines pour étayer les données obtenues sur les dosages par ICP-MS et µ-PIXE/RBS.

Dans le blé cultivé sur les sols naturels, on note que ce n'est pas la racine qui a poussé dans le sol le plus riche en titane (loam argileux) qui présente le plus grand nombre de cps/pt (127 cps/pt). Cette observation vient donc confirmer notre hypothèse de la non biodisponibilité du titane dans les sols argileux et les résultats du dosage par µ-PIXE/RBS. A l'inverse, le sable qui contient très peu de titane présente une racine avec un nombre de cps/pt maximum de 240. Enfin, la racine la plus riche en titane est la racine ayant poussé dans le sable limoneux (724 cps/pt).

Si l'on s'intéresse aux racines ayant poussées dans les sols artificiellement contaminés, le nombre de coups détecté sur l'épiderme augmente (sauf pour le loam argileux). Le nombre de coups dans la racine est lui aussi accru. L'augmentation du nombre de coups la plus importante a été constatée dans les racines exposées sur sable et sable limoneux. Ces données suggèrent qu'en cas de

contamination, les végétaux poussant sur des sols sableux accumuleraient plus de titane que les végétaux poussant sur sols argileux.

En conclusion, plus le sol est riche en argile, moins le titane est biodisponible, que ce soit à l'état naturel ou après contamination. Ainsi, une contamination aigue aux NPs de TiO_2 sur un sol sableux aura pour conséquence une contamination des aquifères sous-jacents (forte lixiviation) et des végétaux poussant sur ce sol (forte biodisponibilité). En revanche, cette même contamination sur un sol argileux aura pour conséquences une accumulation du titane dans le sol mais avec un faible transfert vers les aquifères et les végétaux.

4.4. Coordination du titane

Grâce à la spectroscopie d'absorption des rayons X, nous avons étudié la spéciation du titane dans les différents sols et dans les plantes, à la fois dans les sols naturels et dans les sols artificiellement contaminés (Figure 107 ; Figure 108).

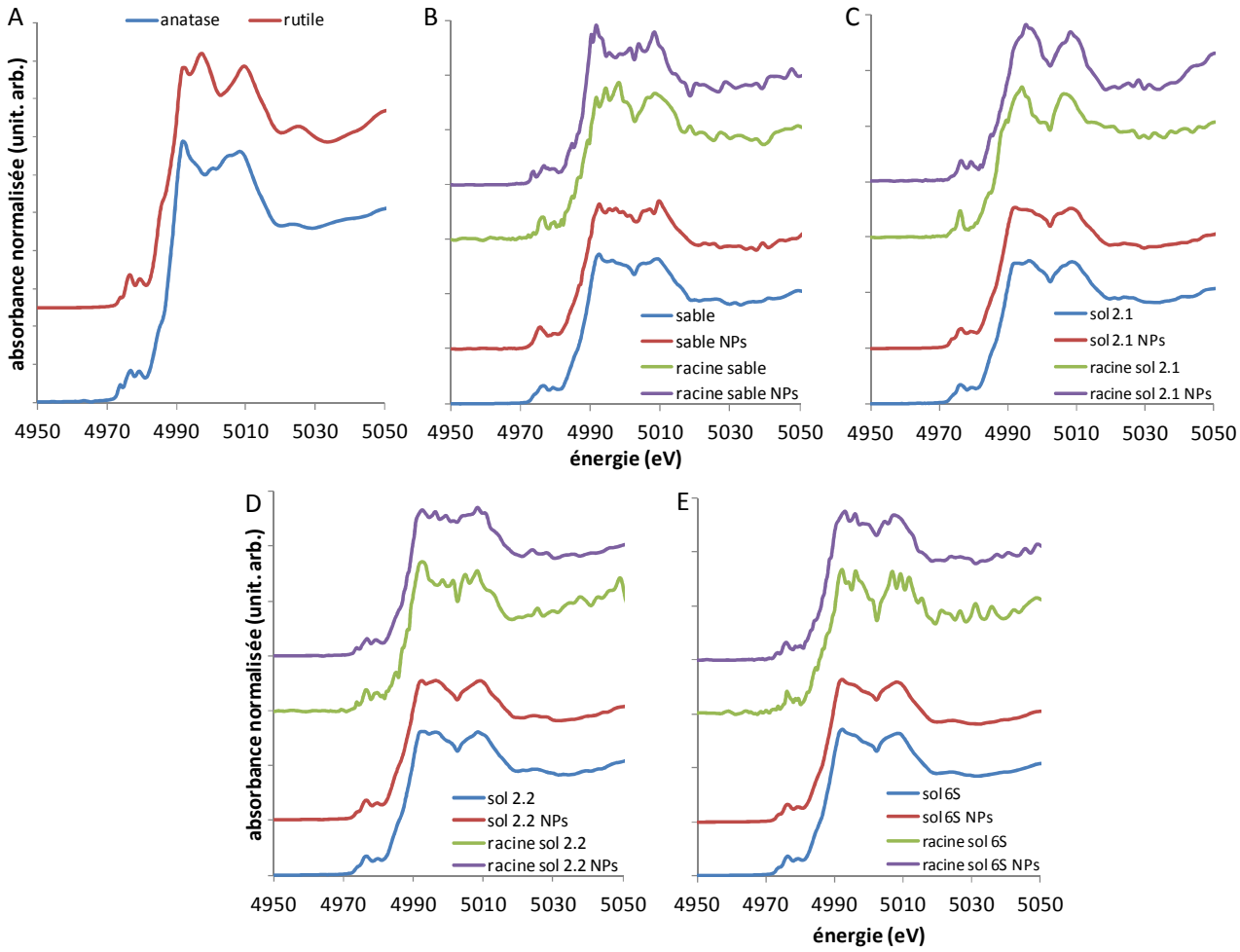


Figure 107 : Analyse en XAS de la coordination du titane dans les sols et dans les plantes. A. Spectres de référence sur des nanopoudres. Spectres obtenus dans le système sable (B), sable limoneux (sol 2.1, C), sable loameux (sol 2.2, D) et loam argileux (sol 6S, E).

De ces spectres (Figure 107), on peut tirer deux informations principales. D'une part, l'allure générale des spectres dans les sols semble être un mélange des formes anatase et rutile. D'autre part, les spectres issus des racines sont bruités du fait d'une faible concentration en titane. Pour obtenir des informations plus précises, un zoom a été réalisé sur la zone du pré-seuil de ces spectres (4970-4980 eV). Ils sont présentés dans la Figure 108.

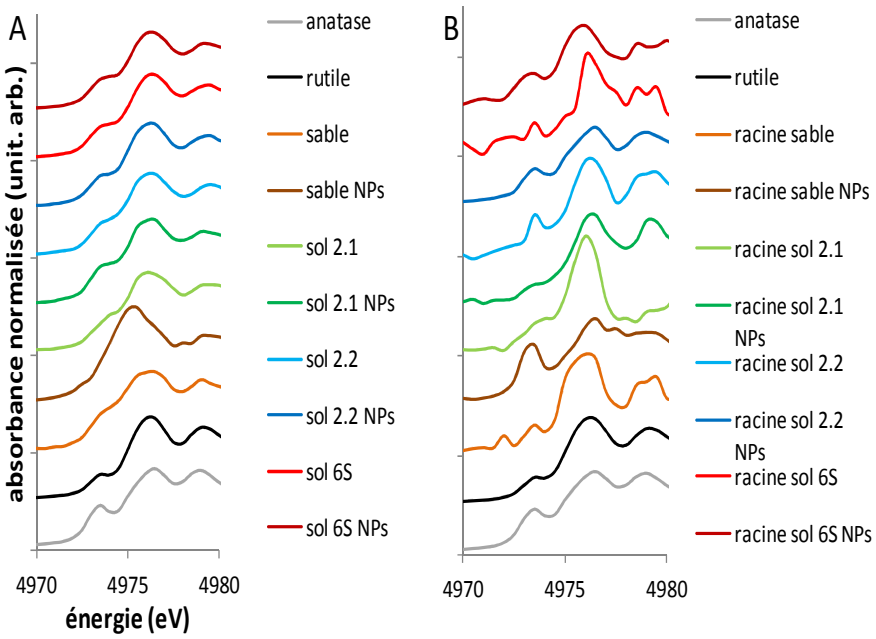


Figure 108 : Analyse XAS, zoom sur le pré-seuil des spectres. A. Spectres obtenus dans les sols (sol 2.1 = sable limoneux, sol 2.2 = sable loameux, sol 6S = loam argileux) naturels ou artificiellement contaminés (NPs). B. Spectres obtenus dans les racines de blé poussant sur sols naturels ou artificiellement contaminés (NPs).

Les pré-seuils des spectres des sols naturels et artificiellement contaminés sont rassemblés dans la Figure 108A. Exceptés les spectres obtenus dans le sable artificiellement contaminé, tous ces pré-seuil semblent être caractéristiques d'un mélange de formes anatase et rutile, qu'ils aient été acquis dans les sols naturels ou dans les sols artificiellement contaminés avec des NPs de forme anatase. D'autre part, concernant les sols artificiellement contaminés, la quantité de TiO_2 de forme anatase ajoutée dans les sols est très faible en regard des concentrations naturelles (de l'ordre de 1%). Pour ces deux raisons, il n'est pas possible de tirer des conclusions précises de ces spectres. Pour le sable, le signal obtenu dans la zone du pré-seuil est lui aussi bruité. On rappelle que le sable est le substrat testé qui présente la plus faible concentration en titane naturel. Si dans le sable naturel, la zone du pré-seuil semble signer la présence d'un mélange d'anatase et de rutile, celle obtenue dans le sable artificiellement contaminé n'est pas interprétable.

Les spectres obtenus *in situ* dans les zones fortement concentrées en titane observées dans les racines sont également très bruités. Leur interprétation n'est donc pas possible.

La faible concentration de NPs de TiO_2 anatase fixée dans ces sols ne nous permet pas de relier de façon catégorique l'augmentation des teneurs en titane observée dans les racines à une internalisation de ces NPs. Dans ce cas, il faudrait trouver une autre technique de marquage (radiomarquage ou marquage fluorescent, par exemple) pour s'assurer que la surconcentration en titane dans les racines exposées dans des sols contaminés est bien liée à une internalisation de NPs.

4.5. Discussion

Nos résultats montrent que le principal critère à considérer en cas de contamination aigue dans l'environnement est la **texture du sol**. Du point de vue des végétaux, la contamination sera d'autant plus limitée que le sol sera riche en argile.

En effet, dans les sols argileux, le titane est peu mobile. Ces résultats sont en accord avec la littérature et notamment avec l'étude de Fang sur la mobilité des NPs de TiO_2 (Fang *et al.*, 2009). Dans cet article, les auteurs ont mis en évidence que la mobilité du titane dans différents types de sols était très largement déterminée par la texture du sol. Ainsi, dans les sols contenant plus de 20% d'argile, le titane n'était pas détecté dans les lixiviats. A l'inverse dans les sols sableux, 20 à 80% du titane ajouté initialement était lixivié.

Si le titane est moins mobile dans les sols argileux, c'est que les NPs sont fortement liées aux particules du sol et donc moins biodisponibles pour les végétaux. Ainsi, dans le blé cultivé sur sable loameux contaminé (19% argile), on dose 291 mg Ti/kg MS alors que dans le blé cultivé sur le loam argileux contaminé (79% argile), la concentration est de 4 mg Ti/kg MS. Des résultats similaires sont relatés dans la littérature. Lorsque des citrouilles cultivées sur du sable sont exposées à des NPs de Fe_2O_3 (20 nm), l'accumulation de NPs dans les plantules est faible mais significative. En revanche, lorsqu'elles sont exposées sur un sol (caractéristiques non spécifiées), les NPs sont indétectables dans les végétaux (Zhu *et al.*, 2008). De même, lorsque le ray-grass est cultivé sur un sable contaminé aux NPs d'Al, la concentration en aluminium dans ses feuilles est multipliée par 2,5 (Doshi *et al.*, 2008). Lors d'exposition sur des sols plus argileux, les auteurs ne voient aucune accumulation des NPs. Ainsi, lorsque du blé est exposé à des NPs de TiO_2 (20 nm) dans un loam argileux, aucune accumulation significative de Ti n'est observée (Du *et al.*, 2011). De même, le maïs cultivé sur un sol naturel contaminé aux NPs de CeO_2 n'accumule pas de cérium (Birbaum *et al.*, 2010).

L'influence du substrat sur l'impact des NPs a également été étudiée au travers de tests de phytotoxicité. Comme en hydroponie, les résultats concernant la phytotoxicité des NPs sont très variables. Certains auteurs ne constatent pas d'effet sur les végétaux après exposition aux NPs dans des sols. C'est le cas, par exemple, du haricot et du ray-grass lors d'une exposition sur sable à des NPs d'Al (Doshi *et al.*, 2008) ou du maïs après exposition à des NPs de TiO_2 sur sol argileux (Asli and Neumann, 2009). Au contraire, certains auteurs notent des perturbations du développement comme une diminution de la biomasse du blé exposé sur un loam argileux à 90 mg/kg de NPs de TiO_2 (Du *et al.*, 2011) ou encore une modification du rapport feuille/racine de la laitue après exposition à des NPs Si, Pd, Au, Cu (Shah and Belozerova, 2009).

Une seule étude comparative sur deux substrats a été menée : un sable loameux et un loam argileux. La contamination aux NPs de ZVI de ces sols a un faible impact sur le développement du lin, du ray-grass et de l'orge puisqu'il faut de très fortes concentrations en NPs pour voir les premiers effets inhibiteurs : 1000 mg/kg sur sol sableux. Ces effets sont encore moins prononcés dans le sol argileux (El-Temsah and Joner, 2010).

Enfin, la plupart des études a mis en évidence la diminution de l'accumulation ou de l'impact des NPs lorsque les expositions sont réalisées sur des sols plutôt qu'en hydroponie. Ainsi, Zhu et al. identifient une internalisation de NPs de Fe_2O_3 quand les citrouilles sont cultivées en hydroponie. Cette accumulation disparait lorsque l'exposition est réalisée sur sol (Zhu *et al.*, 2008). Les effets sur le développement semblent également diminués puisque des inhibitions de développement

constatées en hydroponie ont été largement levées lors d'exposition sur des sols (Asli and Neumann, 2009; El-Temsah and Joner, 2010).

Nos résultats n'ont pas souligné de tels effets. En ce qui concerne la phytotoxicité, aucun effet des NPs de TiO_2 n'a pu être mis en évidence que ce soit en hydroponie ou, visuellement, lors d'exposition dans les sols. Quant à l'internalisation de titane dans les racines, elle est toujours visible et dans les mêmes ordres de grandeur qu'en hydroponie. Cette différence est peut être à relier au type de sol testé dans les expériences décrites dans la littérature. En effet, lorsque les caractéristiques des sols sont détaillées, on constate que les résultats montrant une diminution des effets toxiques ou de l'accumulation sont consécutifs à des expositions en sol argileux. Or, nous avons vu qu'un sol argileux pouvait rendre les NPs moins biodisponibles, ayant pour conséquence de réduire leurs effets.

5. Synthèse du chapitre

SYNTHESE DU CHAPITRE

- Accumulation des NPs de TiO_2 dans les végétaux
  - En hydroponie, par voie racinaire
    - Internalisation racinaire jusqu'à un diamètre nominal de 35 nm
    - Transfert vers les parties aériennes jusqu'à un diamètre nominal de 25 nm
    - Pas de répartition préférentielle
    - Concentration en mg Ti/kg MS
    - Conservation de la structure des NPs
  - En hydroponie, par voie foliaire
    - Internalisation des NPs (12 nm) dans la feuille exposée
    - Transfert vers les feuilles en croissance
  - Sur sol, exposition racinaire
    - Internalisation racinaire (25 nm)
    - Concentration en mg/kg MS
    - Importance de la texture du sol

- Phytotoxicité des NPs de TiO_2 envers les végétaux (en hydroponie)
  - Induction de l'élongation racinaire jusqu'à un diamètre nominal de 20 nm
  - Aucun effet sur la germination, la biomasse sèche, l'ETP, la nutrition hydrominérale et sur le contenu en pigments photosynthétiques, en TBARS et en H_2O_2

- Influence des caractéristiques physico-chimiques (en hydroponie)
  - Diamètre nominal très influant (détermine l'internalisation, le transfert et la phytotoxicité)
  - Diamètre hydrodynamique influant (détermine en partie le transfert vers les feuilles)
  - Phase cristalline pas d'influence notable

- Influence de l'espèce végétale
  - Accumulation plus importante dans le colza que dans le blé
  - Comportement identique vis-à-vis de la phytotoxicité des NPs

CHAPITRE 5 : IMPACT DES NANOTUBES DE CARBONE

CHAPITRE 5 : IMPACT DES NANOTUBES DE CARBONE 173

1. Accumulation et impact des MWCNTs chez deux végétaux : le blé et le colza 175

2. Influence du diamètre extérieur des NTC et de leurs propriétés de surface sur les effets générés sur le blé et le colza 193

2.1. Impact sur le développement du blé et du colza 193

2.2. Impact sur la physiologie du blé 194

2.3. Discussion des résultats 195

3. Synthèse du chapitre 196

En parallèle des expériences menées sur le blé et le colza après une exposition à des NPs de TiO_2, l'évaluation de l'accumulation et de la phytotoxicité des NTC a également été réalisée sur ces végétaux. Le but de cette série d'expérience est de comparer l'accumulation et les effets de deux différents types de nanomatériaux sur les végétaux : NPs sphériques (TiO_2) et nanofibres (NTC). Trois types de NTC ont été testés, nous permettant d'évaluer l'influence des caractéristiques physico-chimiques telles que le diamètre extérieur et les propriétés de surface des NTC sur leur impact sur les végétaux.

Les expositions ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les NPs de TiO_2 : mêmes doses (0, 10, 50 et 100 mg/L), même type d'exposition (racinaire en hydroponie) et même milieu d'exposition (eau ultrapure et Hoagland).

L'internalisation des NTC a été recherchée par le couplage de différentes techniques de microscopie (MET/MEB) et d'analyse (spectroscopie Raman, autoradiographie). La matrice végétale et les NTC sont en majorité composés de carbone ; ainsi, les techniques utilisées pour détecter le titane dans les tissus végétaux n'ont pu être utilisées. Nous avons donc adapté les techniques d'analyse à cette contrainte. Nous avons eu recours à des MWCNTs radiomarqués, synthétisés à partir d'un précurseur enrichi en carbone 14. Ces nanotubes sont très fortement marqués (environ 390 µCi/mg) et sont, de ce fait, détectables dans les tissus végétaux par autoradiographie, même lorsqu'ils sont localement présents en très faible quantité. Cette technique permet à la fois d'identifier la répartition des NTC mais également d'obtenir des données d'accumulation quantitatives. De plus, les NTC possèdent un signal très spécifique en spectroscopie Raman. L'utilisation de cette technique permet donc de différencier dans une plante, le signal provenant du carbone sous forme de NTC du signal provenant du carbone organique.

L'impact des NTC sur le développement et sur la physiologie des végétaux a fait l'objet des mêmes tests que lors de l'évaluation de l'impact des NPs de TiO_2 : taux de germination, élongation racinaire, biomasse et ETP pour le développement ; photosynthèse, TBARS et H_2O_2 pour la physiologie.

1. Accumulation et impact des MWCNTs chez deux végétaux : le blé et le colza

Le radiomarquage au carbone 14 a été mis au point sur les MWCNTs, ce sont donc ces NTC qui ont été les plus étudiés dans cette thèse.

Nous avons ainsi pu prouver que les MWCNTs (Ø : 54 nm, longueur : 1 µm) étaient transférés du milieu d'exposition vers les feuilles du blé et du colza. Ce transfert est effectif quel que soit le milieu d'exposition : eau ou Hoagland, et quel que soit le dispersant utilisé : GA ou AH. Les NTC sont accumulés en plus grandes proportions dans le colza (612 µg NTC/kg MS) que dans le blé (466 µg NTC/kg MS).

La répartition des NTC est inhomogène au sein d'une même plante avec une accumulation préférentielle vers les feuilles néoformées pendant la durée de l'exposition. Par exemple, les feuilles déjà développées au moment de l'exposition accumulent 43 et 1024 µg NTC/kg MS alors que les feuilles en formation accumulent respectivement 940 et 2444 µg/kg pour le blé et le colza, soit une accumulation multipliée par 22 et 2 pour les feuilles en développement.

La répartition est également inhomogène à l'échelle de la feuille puisque les NTC sont observés en plus grandes quantités à la périphérie des feuilles.

Tous scénarios d'exposition confondus, le facteur de transfert du milieu d'exposition vers les parties aériennes reste inférieur à $2{,}9\times10^{-5}$, ce qui est faible.

Enfin, tous les indicateurs de développement et de physiologie restent inchangés après une exposition aux MWCNTs en suspension.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article qui a été soumis à ES&T (Environmental Science and Technology).

Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed

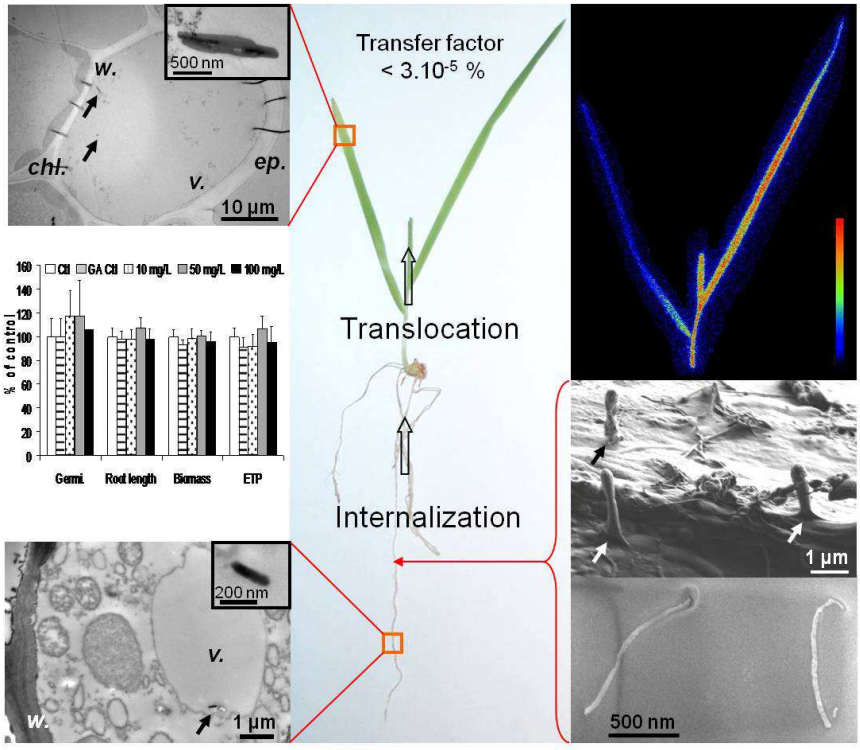
*Camille Larue[1], Mathieu Pinault[2], Bertrand Czarny[3], Dominique Georgin[4], Danielle Jaillard[5], Nedjma Bendiab[6], Martine Mayne-L'Hermite[2], Frédéric Taran[4], Vincent Dive[3], Marie Carrière[1,7]**

[1]UMR3299 CEA-CNRS, Service Interdisciplinaire des Systèmes Moléculaires et Matériaux, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France
[2]CEA, IRAMIS, SPAM, Laboratoire Francis Perrin (CNRS URA 2453), 91191 Gif sur Yvette, France
[3]CEA, iBiTecS SIMOPRO, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France
[4]CEA, IBiTecS, SCBM, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France
[5]UMR8080 CNRS-Université Paris-Sud XI, Centre Commun de Microscopie Electronique, F-91405 Orsay, France
[6]Institut Néel, CNRS-Université Joseph Fourrier, 25 rue des Martyrs, 38049 Grenoble Cedex 9, France
[7]UMR E3 CEA-Université Joseph Fourrier, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN), 38054 Grenoble Cedex 9, France

*Correspondence: Marie Carrière, new permanent address: CEA Grenoble, LAN, Bât C5, pce 632, 38054 Grenoble Cedex 9, France. +33438780328. marie.carriere@cea.fr

Abstract

Contamination of the environment by carbon nanotubes is forecast to increase in the coming years, leading to plant exposure and particularly exposure of agricultural crops. The only quantitative exposure data available to date which can be used for risk assessment comes from computer modeling. In this context, the aim of this study was to demonstrate and provide quantitative data relative to multi-walled carbon nanotube (MWCNT) uptake and distribution in agricultural crops, together with an evaluation of their toxicological impact. We investigated a novel and interesting approach based on exposure of roots of both wheat and rapeseed plantlets to uniformly ^{14}C-radiolabelled MWCNTs. Our approach enabled us to demonstrate MWCNT uptake and root-to-shoot translocation. We provide distribution images and quantitative measurements of MWCNT leaf accumulation. Less than 2.9×10^{-5} of the MWCNTs to which plants were exposed were transferred from exposure medium to plant shoots. Contamination with MWCNTs did not impact seed germination, root elongation, plant biomass or evapotranspiration. In addition, it did not induce modifications in photosynthetic activity or cause oxidative stress in plant leaves. Our results suggest that if environmental contamination occurs, MWCNT transfer to the food chain via food crops will be very low.



Keywords: carbon nanotubes, plant, accumulation, distribution, quantification, ecotoxicity, bioavailability

Introduction

The field of nanotechnology has expanded exponentially over the last ten years. Nanoparticles (NPs) are introduced in consumer goods such as cosmetics, paints, sporting devices, sportswear, and are probably released into the environment during the production process or lifecycle of these products (Du *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011). Although widely used, no clear consensus exists on the impact of carbon-based NPs and more particularly carbon nanotubes (CNTs) on the environment (Ma *et al.*, 2010a). Computer modeling foresees a substantial contamination of soils and surface waters by CNTs and their concentrations in sediments and agricultural soils treated with sewage sludge are forecast to increase every year by 241 and 74 ng/kg, respectively (Gottschalk *et al.*, 2009). Moreover CNTs have been demonstrated to be highly mobile in sand (Tian *et al.*, 2011). In this context, plant roots may be exposed to CNTs. Studying their potential uptake and impact is thus a major concern.

The field of NP and CNT impact on edible plants has recently been reviewed (Rico *et al.*, 2011). CNTs have been shown to be deleterious, beneficial or induce no effect on seed germination, root length and plant biomass depending on the exposed plant species. On rice plantlets, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) dispersed in natural organic matter (400 mg/L) caused delayed flowering while reducing seed setting rate and weight per 100 seeds (Lin *et al.*, 2009c). MWCNTs are insignificantly taken up by rice roots (Lin *et al.*, 2009c). On tomatoes grown on CNT-contaminated agar (10-40 mg/L), seed germination is accelerated and the germination rate is increased. The biomass of the resulting plants is increased as compared to controls (Khodakovskaya *et al.*, 2011). When present in tomato seed coats, CNTs are transferred to roots, leaves and fruits (Khodakovskaya *et al.*, 2009). On leaves and roots, CNT exposure (50-200 mg/L) causes up-regulation of several genes implicated in plant response to stress and a gene coding a protein of water-channel pores (Khodakovskaya *et al.*, 2011). MWCNTs also penetrate walls and membranes of isolated plant cells, where they cause toxic effects: decreased cell viability and chlorophyll contents, and generation of oxidative stress (Rico *et al.*, 2011).

The pioneering work by Khodakovskaya *et al.* demonstrates the uptake and transfer of CNTs in tomato plantlets. However quantitative data and MWCNT distribution in plant tissues are not reported. In a risk assessment perspective, it is all the more important to quantify MWCNT uptake and transfer to plant shoots. Moreover, as uptake has been demonstrated in tomato, it is essential to assess MWCNT accumulation in other agricultural species in order to evaluate whether MWCNT uptake is a general phenomenon or a specific trait of tomato.

The aim of this article is to fill-in these gaps. Thanks to an original labelling strategy and the ability to produce ^{14}C-labelled multi-walled carbon nanotubes (MW^{14}CNTs) in our laboratories, we prove that MWCNTs are taken up by wheat and rapeseed, and transferred from the roots to the shoots. This novel experimental approach makes it possible to describe MWCNT distribution in plant leaves, provide quantitative data for these transfers and correlate them to impact on plant development and physiology.

Experimental

MWCNT preparation and characterization

Two batches of aligned MWCNTs were produced in the same experimental set-up using similar synthesis conditions. One is prepared from a ^{14}C-labelled precursor and the other from a cold precursor. Aligned MWCNTs were produced by aerosol-assisted CCVD (Catalytic Chemical Vapor Deposition) (Pinault *et al.*, 2005). Carbon and catalytic sources were benzene and ferrocene, respectively. Both precursors were injected simultaneously into the reactor at 850°C, under argon gas flow. Two solutions of benzene and ^{14}C-labelled (500 mCi) benzene containing 2.5 wt. % of ferrocene were used to synthesize both nanotube samples (^{14}C labelled and unlabelled one) for 45 min. The two samples were formed of aligned nanotube carpets covering the reactor walls. The carpet pieces were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (FEG-SEM; Carl Zeiss Ultra 55 and JEOL 5400) and Transmission Electron Microscopy (TEM) (Philips CM 30; CEA Saclay, DEN-LM2E, France) in order to validate our new experimental set-up and to analyze the MWCNT carpets obtained. Both samples exhibit very similar characteristics. They were composed of well aligned MWCNT carpets of 50 µm thick. They contained almost no by-products (amorphous carbon or encapsulated metal particles) except inside nanotubes. They contained iron-based particles at their basis (catalyst particles) and inside their hollow core, as observed on different aligned MWCNT batches produced by this process[11]. Their mean diameter was 41.2 nm.

MWCNTs were dispersed by ultrasonication at 4°C (1 h, 750 W, 28% of amplitude, pulsed mode: 1s on followed by 1s off) in ultrapure water containing 0.25 % of either gum arabic (GA) or humic acid (HA). MWCNT concentration in both suspensions was 1 g/L. Dispersion process did not modify MWCNT diameters. As previously published (Glory *et al.*, 2007), high energy ultrasound treatment induced breakage of MWCNTs. A combination of TEM and optical microscopy observation (more than 200 nanotubes) was used in order to measure MWCNT length in these suspensions (Figure S1). A droplet of MWCNT suspension was deposited on a TEM grid or on a glass slide and observed on a Philips CM30 microscope operating at 300 kV or a Olympus BX60 optical microscope, respectively. MW^{14}CNT length ranged from 1 to 18 µm with an average of 3.9 µm.

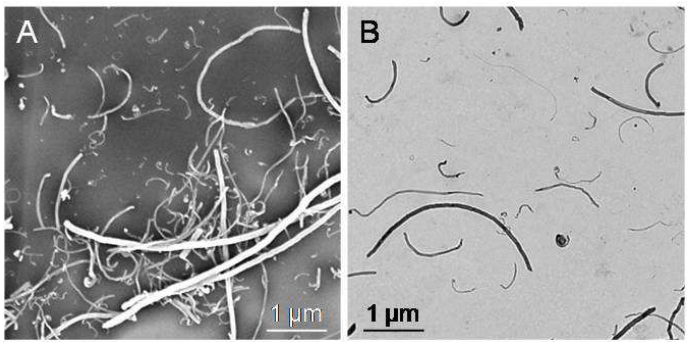


Figure S1. Electron microscopy observations of MWCNT suspensions. MWCNTs were sonicated in an aqueous solution of GA, deposited on a TEM copper grid and observed on a SEM-FEG (A) and on a TEM (B).

For plant exposure, these suspensions were then diluted either in ultrapure water or in Hoagland solution (0.5 mM $MgSO_4$, 2.5 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.5 mM KH_2PO_4, 2.5 mM KCl, 25 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 0.4 µM $ZnSO_4$, 0.2 µM $CuSO_4$, 0.25 µM Na_2MoO_4, 4 µM Fe-Na-EDTA, pH 5.5).

Plant culture and treatment

Seeds of wheat (*Triticum aestivum*, Courtaud, monocotyledonous) and rapeseed (*Brassica napus,* dicotyledonous) were sterilized using $Ca(ClO)_2$ (1%) and germinated for 15 days on sand soaked with Hoagland solution. Each plantlet was then transferred to an individual tube (Figure S2) containing MWCNTs or MW^{14}CNTs. This procedure was set up to avoid any possible accidental leaf contamination by the MWCNT suspension.

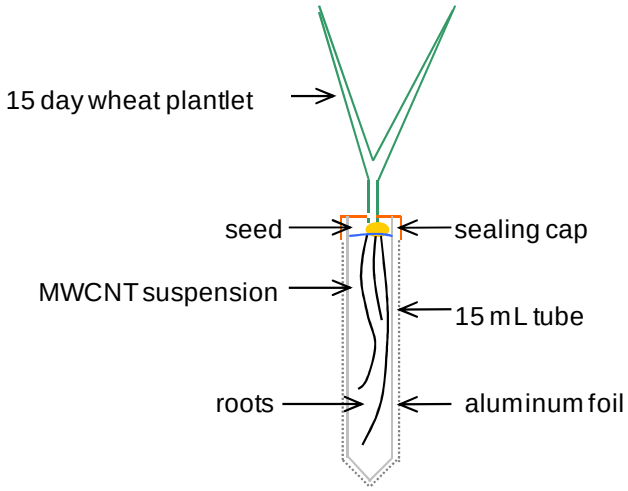


Figure S2. Experimental setup for hydroponics root exposure. This system protects roots from light and avoids any leaf contamination upon root exposure to MWCNT suspensions.

We took great care not to touch plant roots during transfer, and we chose not to agitate exposure media to prevent root damage that can permit free entrance of MWCNTs into roots. The tubes were covered with aluminum foil to protect the roots from light. Plants were exposed to MWCNTs for 7 days in accumulation and electron microscopy experiments, as well as to investigate MWCNT impact on plant development. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and H_2O_2 content were measured after 24 h exposure. All experiments were carried out in a growth chamber under controlled conditions: day/night photoperiod (16/8 h), day/night temperature (24/20 ± 1 °C) and day/night relative humidity (70/75 %).

MWCNT localization and quantification

Leaves of MW^{14}CNT-exposed plants were dried overnight at 60°C, deposited in a ^{14}C holder and imaged with radio-imagers (Beta imager 2000 or Micro imager, Biospace). Images were analyzed with the β-vision software, making it possible both to evaluate MW^{14}CNT distribution in vegetal organs and to quantify MW^{14}CNT incorporation. The resolution was 500×500 µm² on the beta-imager and 15×15 µm² on the micro-imager.

For each of the three replicates per experiment, quantitative determination of ^{14}C incorporation in leaves was evaluated by normalization thanks to a reference (^{14}C-fluorodesoxyglucose, 0.01 and 0.001 nCi), spotted close to the leaves in the ^{14}C holder. The threshold of the radio-imager used for ^{14}C detection is 0.02 cpm/mm².

For all other experiments, we used non-radiolabelled MWCNTs. For SEM and TEM, roots were carefully washed to eliminate CNTs that were not strongly adsorbed on the surface, then root and leaf portions were sampled. For SEM observations, samples were freeze-dried and observed without any metallization on a Carl Zeiss Ultra 55 operated at 1 kV. For TEM observations, samples were fixed at room temperature in a mixture of 3% (vol./vol.) glutaraldehyde and 1% (vol./vol.) paraformaldehyde prepared in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), then post-fixed in 2% (vol./vol.) OsO_4 and finally dehydrated in graded concentrations of ethanol before being embedded in Spurrs' resin. Ultrathin sections (70 nm) were prepared, deposited on coated copper grids (Agar Scientific) and observed on a Philips EM 208 TEM operated at 80 kV. Throughout the process, great care was taken in manipulating samples while avoiding contamination of plant sections with MWCNTs: controls were cut first, then leaves and finally roots. Between each cutting, the diamond knife was carefully cleaned. We can thus ensure that controls and leaves were free from exogenous MWCNT contamination. Micro-Raman spectroscopy was performed with a commercial Witec Alpha 500 spectrometer in a back-scattering configuration. The excitation wavelength for all presented Raman experiments was the 532 nm line with a power around 700 µW on the sample to prevent any damage. All Raman spectra were recorded with a 500 nm diameter laser spot.

MWCNT impact on plant development and physiology

Seed germination and root length assays were conducted according to US-EPA guidelines. Seeds were germinated in 0, 10, 50 or 100 mg/L of MWCNTs. After 7 days, germination rate and root length were recorded.

Five plantlets per condition were transferred into individual tubes to continue their growth in Hoagland solution for 7 days. Plantlets were then dried at 60°C for 48 h and their dry biomass was recorded. Evapotranspiration was evaluated by measuring the remaining culture medium in each exposure tube.

Photosynthetic pigments were extracted by grinding 100 mg of fresh leaves in 30 mL of 80% acetone, and further macerated in this solvent for 24 h at 4°C. Pigment content was evaluated by measuring absorption at 470, 645 and 663 nm (Moran, 1982). TBARS and H_2O_2 extraction were achieved by grinding 100 mg of fresh leaves in 7 mL of 0.1% trichloroacetic acid. TBARS content was evaluated by spectrophotometry at 532 nm and 600 nm after 30 min reaction at 95°C with a mixture of 0.5% thiobarbituric acid in 20% trichloroacetic acid. H_2O_2 was assessed by adding 0.5 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 6.8) and 2 mL of KI (1M) to 0.5 mL of the extract. After 1 h in the dark, absorbance was read at 390 nm (Wang *et al.*, 2008b).

Statistical analysis

All experiments were reproduced independently three times. Significant difference was determined by the non-parametric test of Kruskall-Wallis with $*p<0.05$.

Results and discussion

MWCNT uptake and distribution in plant leaves

To identify and quantify MWCNT uptake and distribution in wheat and rapeseed, we used MW^{14}CNTs produced in our laboratories from ^{14}C-benzene. The radiolabelling is thus a uniform bulk labelling, and not a surface post-synthesis labelling that could induce chemical modification which would potentially affect *in planta* bioaccumulation and/or retention of CNTs. Moreover, ^{14}C release from bulk-labelled subjects would take place only if MWCNTs were degraded. The batch used for these experiments had a specific activity of 387 µCi/mg. This corresponds to the incorporation of one atom of ^{14}C every ten atoms of ^{12}C.

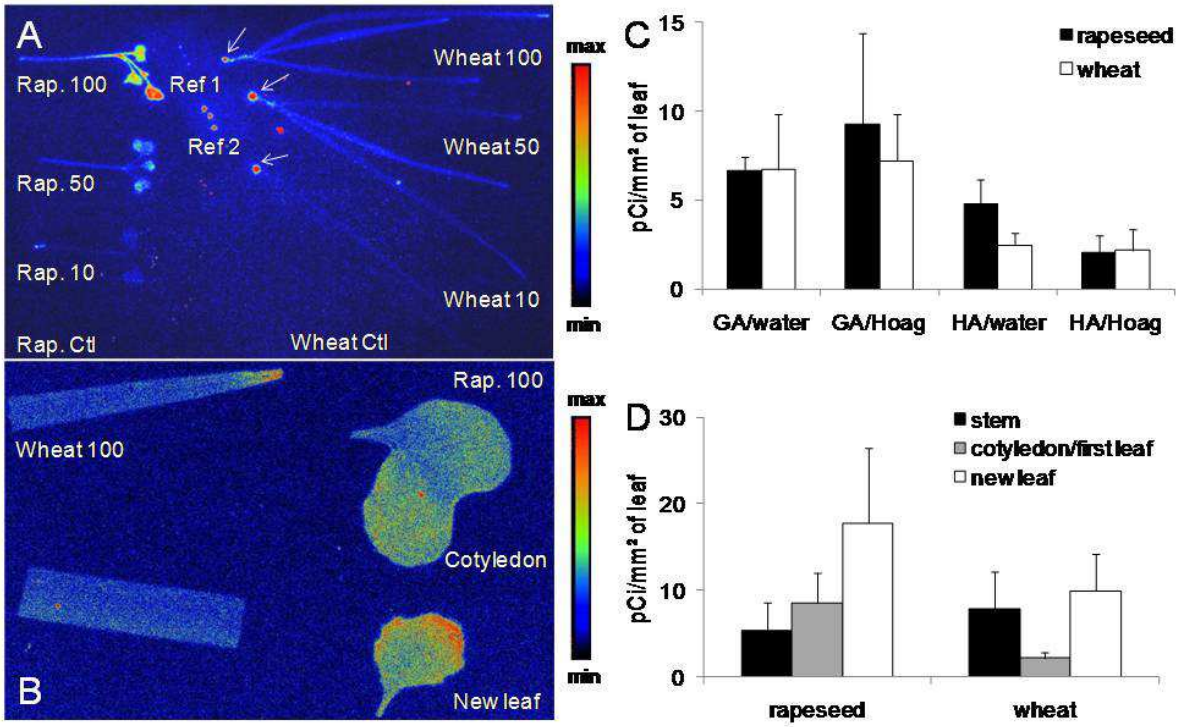


Figure 1. MW^{14}CNT accumulation in plant leaves. Wheat and rapeseed (Rap.) plantlets were exposed to 0 (Ctl), 10, 50 or 100 mg/L of MW^{14}CNTs for 7 days; leaves were sampled and dried. Distribution of MWCNTs was obtained by radioimaging (A) and micro-radioimaging (B) of these leaves. Quantification of MWCNT accumulation was calculated by integration of the total radiolabelling in each leaf or stem, and comparison with the radiolabelling provided by references (^{14}C-fluorodesoxyglucose, Ref1: 3 drops of 0.01 nCi each and Ref2: 3 drops of 0.001 nCi each). Accumulation was measured on plantlets exposed to 50 mg/L of MWCNTs prepared by sonication in GA (0.25%) or HA (0.25%) then diluted in ultrapure water (water) or in Hoagland solution (Hoag) (C). MWCNT content was measured in each organ, for instance here on plants exposed to MW^{14}CNTs prepared in GA and diluted in Hoagland solution (D). Data are the mean of three replicates ± s.d.

Plants were exposed to a MW^{14}CNT suspension prepared by sonication in GA then diluted in ultrapure water. Radio-imaging analysis demonstrated the presence of radioactivity in both wheat and rapeseed leaves, suggesting that MW^{14}CNTs had been taken up and translocated to leaves (Figure 1A and Figure S3A). Radioactivity was not distributed homogeneously in leaves, with higher

accumulation at the periphery (Figure 1B and Figure S3B). Note that the highly-contaminated zone at the base of wheat leaves (Figure 1A, arrows) is due to direct contamination: $MW^{14}CNT$ suspension moved up from the immersed roots along the base of the stem by capillarity. $MW^{14}CNT$ uptake efficiency was dose-dependent in rapeseed, and saturated in wheat for exposure concentrations higher than 50 mg/L (Figure S4).

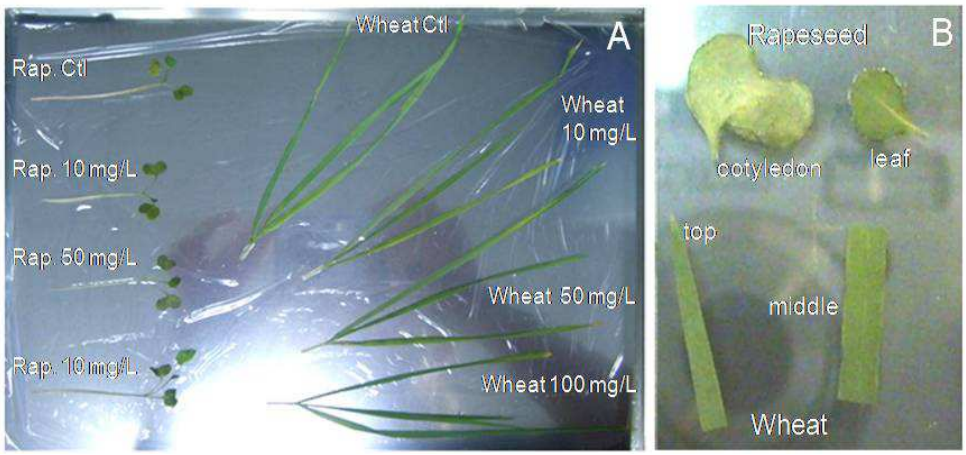


Figure S3. Observation of wheat and rapeseed leaves before radioimaging. Wheat and rapeseed (Rap.) plantlets were exposed to 0-100 mg/L of $MW^{14}CNTs$ then dried overnight at 60°C. They were radioimaged on a beta-imager (A) or a micro-imager (B). For micro-imaging, plantlets exposed to 100 mg/L of $MW^{14}CNTs$ were sectioned and imaged.

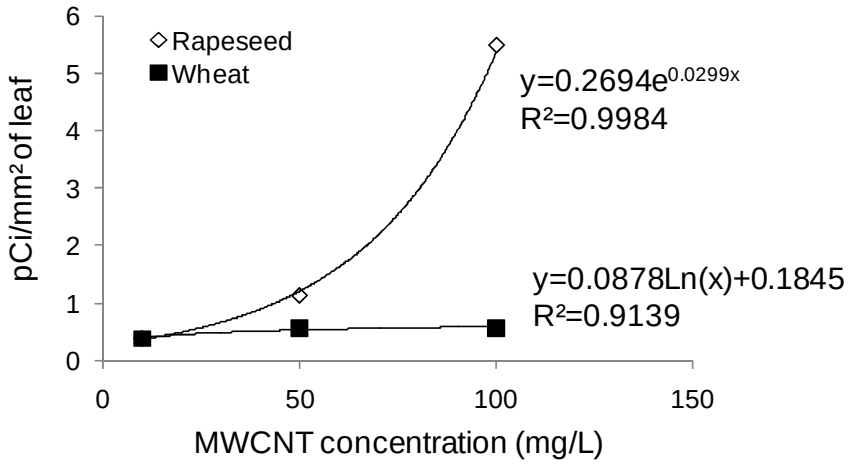


Figure S4. Dose-dependent MWCNT uptake. 15 day-old wheat and rapeseed plantlets were exposed to 0, 10, 50 or 100 mg/L of MWCNTs for 7 days.

A second experiment was designed to precisely quantify MWCNT content in both species. For this experiment $MW^{14}CNT$ suspensions were prepared either in GA or in HA, and diluted to 50 mg/L by addition of either ultrapure water or Hoagland solution. Whatever the exposure condition, radioactivity counts were found to be equal or higher in rapeseed than in wheat (Figure 1C), suggesting that $MW^{14}CNT$ accumulation was higher in rapeseed. For instance, in plantlets exposed to MWCNTs sonicated in GA and diluted in Hoagland solution, total activity in leaves reached 7.2 and 9.3 pCi/mm² in wheat and rapeseed, respectively, corresponding to 572 and 1249 µg CNT/kg of dry weight (for estimation of $MW^{14}CNT$ concentrations in plant leaves, expressed as µg CNT/kg of dry

weight, see Table S1). Higher radioactivity counts were observed when MW^{14}CNT suspensions were prepared in GA rather than in HA. Dilution in ultrapure water or in Hoagland solution did not significantly modulate ^{14}C accumulation in leaves, but exposure in Hoagland solution led to MWCNT agglomeration and sedimentation (Figure S5). Note also that rapeseed plantlets exposed in water grew less than those exposed in Hoagland solution.

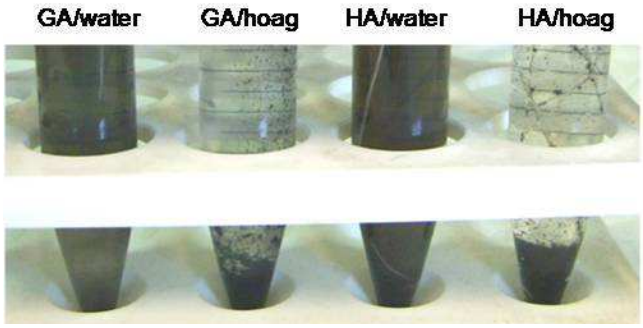


Figure S5. Evidence of MWCNT agglomeration in Hoagland solution. Picture of the bottom of vials 24 h after the beginning of root exposure to MWCNTs, prepared either by sonication in GA and dilution in water (GA/water) or sonication in GA and dilution in Hoagland solution (GA/hoag) or sonication in HA and dilution in water (HA/water) or sonication in HA and dilution in Hoagland solution (HA/hoag).

This modulation was less significant in wheat plantlets (Table S1). During the time course of exposure, plantlets developed new leaves, and radioactivity counts were higher in these leaves than in older ones (Figure 1D): ^{14}C content per leaf surface in rapeseed was twice as high in new leaves as in older leaves. In wheat, it was multiplied by 5.

Table S1. Accumulation and physiological data[a]

	rapeseed			
	GA/water	GA/Hoag	HA/water	HA/Hoag
Total leaf surface (mm²)	166.2±42.0	577.0±32.8	225.5±6.8	620.8±25.9
Total leaf activity (cpm)	15.5±6.1	77.5±47.3	7.7±1.8	10.2±0.4
Average surface activity (cpm/mm²)	0.09±0.03	0.14±0.10	0.04±0.01	0.02±0.01
Total leaf dry weight (mg)	7.20±1.39	14.90±1.98	5.67±1.09	11.53±0.63
pCi/mm²	6.7±0.6	9.3±4.2	4.8±1.1	2.1±0.8
nCi/mg dry weight	0.15±0.01	0.48±0.15	0.20±0.07	0.11±0.04
µg CNT/kg dry weight	391.4±34.1	1249.2±559.6	523.4±224.1	283.8±131.8
	wheat			
	GA/water	GA/Hoag	HA/water	HA/Hoag
Total leaf surface (mm²)	536.9±94.7	780.3±54.5	710.6±141.4	1076.6±338.9
Total leaf activity (cpm)	44.9±10.7	86.5±48.1	13.7±0.0	16.8±5.8
Average surface activity (cpm/mm²)	0.08±0.02	0.11±0.06	0.02±0.00	0.02±0.01
Total leaf dry weight (mg)	16.67±2.14	24.7±3.1	18.87±4.40	22.67±5.98
pCi/mm²	6.7±2.5	7.2±0.2	2.5±0.6	2.2±0.9
nCi/mg dry weight	0.31±0.06	0.22±0.04	0.09±0.02	0.10±0.03
µg CNT/kg dry weight	798.6±235.0	571.7±129.5	240.6±60.8	250.6±112.4

[a]Data were collected on 15-day old plantlets exposed to 13 mL of 50 mg/L MW^{14}CNTs for 7 days, then dried and radioimaged. Specific activity of MW^{14}CNTs was 387 µCi/mg.

Raman spectroscopy was used to reveal the presence of MWCNTs in plant tissues. The Raman spectrum of suspended MWCNTs after sonication in GA (Figure 2) is composed of a strong band at 1570 cm^{-1} assigned to the in-plane E2g zone center mode (G band). Additional first order line occurring at 1350 cm^{-1} (D band) and at 1610 cm^{-1} (D' band) are identified, which corresponds to disorder-induced phonons (Dresselhaus and Eklund, 2000; Eklund *et al.*, 1995; Thomsen *et al.*, 1999; Dresselhaus and Dresselhaus, 1982) or ion intercalation between graphitic walls (Osswald *et al.*, 2007). These bands are attesting the occurrence of MWCNTs (Eklund *et al.*, 1995) and their position are similar to the ones detected in raw MWCNTs (Castro *et al.*, 2010). In control plants, which were grown in culture medium without MWCNTs, no Raman peak were detected, except a strong luminescence background which can be attributed to vegetal matrix (Figure 2). Strong Raman peaks were detected when analyzing plant roots, at 1350, 1570 and 1610 cm^{-1} which were assigned to D, G and D' MWCNT-characteristic bands, respectively. This specific signature proved that MWCNTs were present in and/or on the roots (not shown). G-band signal was also identified at the periphery of plant leaves (Figure 2). This band was shifted as compared to the G-band observed in suspended MWCNTs, reaching a position at 1590 cm^{-1}. The D' band was also identified at 1620 cm^{-1}, also up-shifted as compared to the peak position of suspended MWCNTs. The intensities of both G and D' bands were reduced in leaves, most probably due to the high intensity of background signal. However, the intensity of D' band as compared to the G band is higher in leaves than in suspended MWCNTs attesting the occurrence of a higher proportion of defects in MWCNTs accumulated in plants. The D band was not detected, undoubtedly due to the high luminescence background of the vegetal matrix masking it.

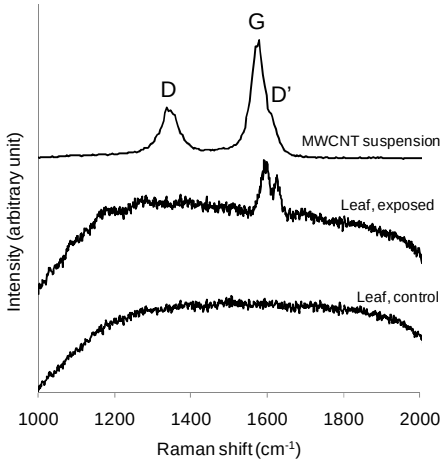


Figure 2. Raman analysis of MWCNT exposure suspension and exposed leaves. Raman spectra of MWCNT suspension, control leaves and leaves of a plantlet exposed to 100 mg/L of MWCNTs for 7 days were recorded. The main features of sp2 nanocarbons are visible (disorder-induced D and D' band, first-order Raman-allowed G-band).

In addition, few MWCNTs were observed by TEM in exposed plant roots and leaves, while no MWCNTs were observed in roots and leaves of control plants (Figure 3A-D). The MWCNTs observed were localized inside cells mainly in vacuoles. Their lengths ranged from 60 nm to 1 µm, suggesting that only the smallest MWCNTs were taken up by plants and/or translocated to aerial parts. No MWCNTs were observed in cell membranes, cell walls or extracellular spaces. Finally, SEM observations showed that root surfaces of control plants, grown in ultrapure water containing 0.25%

GA, were free of nanotubes (Figure 3E). On roots exposed to MWCNTs, nanotubes were found anchored perpendicularly to root surfaces, suggesting that MWCNTs might be able to penetrate plant cell walls (Figure 3F, 3G).

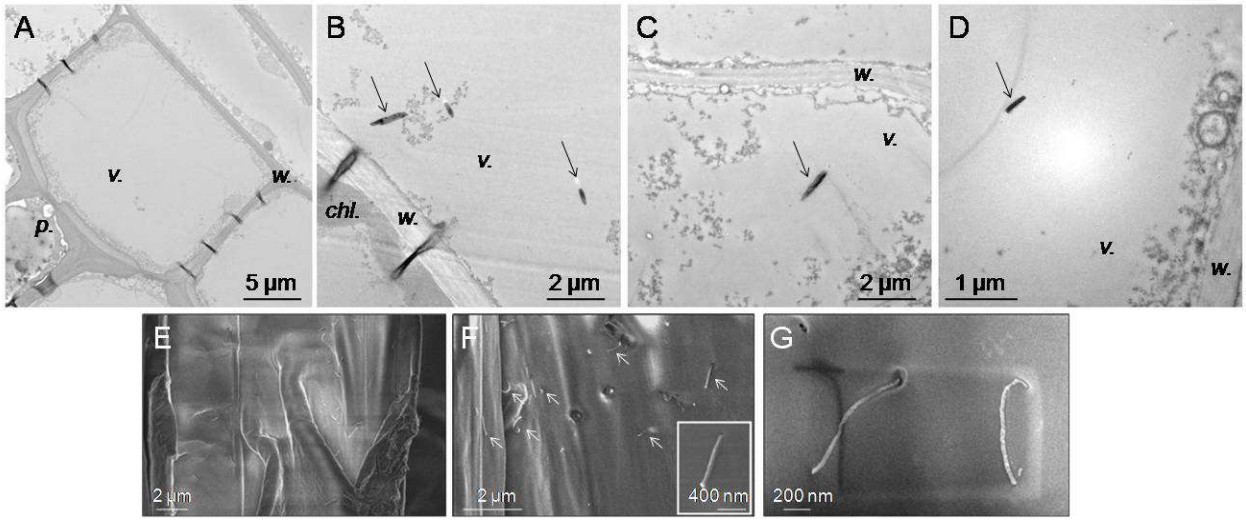


Figure 3. MWCNT distribution in wheat roots and leaves. Root surfaces were observed by SEM (A-C) or TEM (D-G). Roots of unexposed plantlets (A, D), then roots (B, C, E) or leaves (F, G) of plantlets exposed to 100 mg/L of MWCNTs for 7 days. CNTs are indicated by arrows. *chl. chloroplast, ep. epidermis, p. plasmodesmata, v. vacuole, w. wall.*

Thanks to the combination of highly sensitive radio-imaging, Raman spectroscopy and electron microscopy, we succeed in showing that MWCNTs are accumulated in plant tissues, and translocated from plant roots to shoots. For the first time we provide quantitative data of MWCNT accumulation in plant shoots upon root exposure. The transfer factor for MWCNTs (CNT content in leaves/CNT content in exposure medium) is low: no higher than 2.9×10^{-5} (Table S2) even in plants exposed to very high concentrations of MWCNTs (50-100 mg/L).

Table S2. Transfer factors [a]

	HA/water	HA/Hoag.	GA/water	GA/Hoag.
Wheat	7.0×10^{-6}	8.7×10^{-6}	2.1×10^{-5}	2.2×10^{-5}
Rapeseed	4.6×10^{-6}	5.0×10^{-6}	4.3×10^{-6}	2.9×10^{-5}

[a]Transfer factors (TF) were calculated on 15-day old plantlets exposed to 13 mL of 50 mg/L $MW^{14}CNT$ for 7 days, then dried and radio-imaged. Specific activity of $MW^{14}CNTs$ was 387 µCi/mg. TF was calculated as TF = CNT content in leaves (mg) / CNT content in exposure suspension (mg).

We also provide important information on MWCNT distribution upon accumulation in plants, which may inform on their transfer route. Radio-imaging shows that MWCNTs are not homogeneously distributed in plant aerial parts: higher concentrations are observed in leaves than in stems, and in newly developed leaves than in older ones. At the organ scale, micro-imaging shows that MWCNTs are accumulated more in the most peripheral zones of leaves. At the cell scale, we

observed isolated MWCNTs accumulated inside plant cells but not in extracellular spaces and cell walls. This distribution suggests that MWCNTs might be transported from roots to shoots via the sap flow which is driven by plant transpiration as already hypothesized by others (Lin *et al.*, 2009c; Zhang *et al.*, 2011b). Since leaves are the major transpiring organs of plant aerial parts, they would concentrate most of the transported MWCNTs. Developing leaves have higher nutritional demand and are the target of most of the absorbed water and nutrients. This would explain the higher MWCNT accumulation in newly developed leaves than in older ones. MWCNTs would then be transferred from sap vessels to leaf cells, certainly via the symplastic route since we did not observe them in the apoplastic compartment. We observe MWCNTs only in cell vacuoles: MWCNTs may be sequestered in this compartment as are other waste products. A crucial question is the fate of nanotubes in plant vacuoles. Indeed, under very stringent conditions such as oxidation followed by exposure to H_2O_2 and horseradish peroxydase, MWCNTs have been demonstrated to be altered and shortened (Allen *et al.*, 2008; Russier *et al.*, 2011). These transformations do not occur without a strong damaging agent. Consequently they would improbably occur in plant exposure solution. We detected some MWCNTs in plants; however their Raman signature is different from that of MWCNTs in exposure suspension. The intensity of the D' band as compared to the G band is higher in leaves than in exposure suspension attesting the occurrence of a higher proportion of defects in MWCNTs stored in plant leaves. Moreover, the Raman G and D' bands are up-shifted. MWCNTs surfaces are probably modified during plant accumulation and root-to-shoot transfer: the Raman G-band originates from the vibration modes of carbon atoms in graphite sheets thus up-shift of the G band is due to increased energy necessary for vibrations to occur. MWCNTs internalized in cell vacuoles undergo high osmotic pressure which can explain the up-shift in the G-band (Thomsen *et al.*, 1999). More probably this up-shift may be explained by coating with intracellular organic polymers of MWCNTs accumulated in plant tissues, as already demonstrated (Jia *et al.*, 2010; Sinani *et al.*, 2005).

Regarding root accumulation, MWCNTs have been described as being able to pierce the walls of isolated plant cells (Wild and Jones, 2009) and to be taken up by the protoplast both by endocytosis and by direct penetration through the membrane (Serag *et al.*, 2011). The intracellularly accumulated small CNTs (<100 nm) are mainly found in vacuoles, plastids and nuclei (Serag *et al.*, 2011). MWCNTs may enter roots through osmotic pressure, capillary forces or pores on cell walls as hypothesized by others (Lin *et al.*, 2009c) and suggested by our SEM observations of nanotubes piercing root surfaces. It has moreover been proved that MWCNTs induce up-regulation of a water-channel pore protein in tomato. By inducing increased uptake of water in plants, MWCNTs also increase their own translocation to the shoots via plant transpiration.

We show that rapeseed accumulates more MWCNTs in their leaves than does wheat, when accumulation is normalized to leaf surface. During the time course of the experiment and when exposed to 50 mg/L MWCNTs prepared in GA and diluted in water, the average evapotranspiration of rapeseed was 0.53±0.03 mL, whereas that of wheat was 0.71±0.07 mL (not shown). When normalizing evapotranspiration data to leaf surface, rapeseed evapotranspirates more than wheat does. Average evapotranspiration values are 3.2×10^{-3} mL/mm² and 1.3×10^{-3} mL/mm², respectively. Assuming that MWCNTs are taken up by plant roots through water absorption, higher evapotranspiration should lead to higher water consumption and therefore higher MWCNT uptake. MWCNT uptake by plants has already been demonstrated in rice (Lin *et al.*, 2009c) and tomato (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011). It thus appears to be a common phenomenon shared by several basic crops. In rice plantlets, the uptake of MWCNTs stabilized with

natural organic matter is insignificant for exposure concentrations up to 800 mg/L. Few agglomerates of MWCNTs reach plant vascular system (Lin *et al.*, 2009c). In tomato, uncoated but acid-treated MWCNTs are detected in plant roots and leaves by highly sensitive photothermal and photacoustic mapping (Khodakovskaya *et al.*, 2011). Optical microscopy makes it possible to observe large MWCNT agglomerates in roots but not in leaves, suggesting that only small agglomerates or individual MWCNTs reach the aerial parts of tomato (Khodakovskaya *et al.*, 2011). Comparison of all these data suggests that accumulation efficiency can be classified as follows: tomato > rapeseed > wheat > rice. However, since the exposure condition are not exactly the same (MWCNTs coated or not, exposure in water or in several plant culture media), this ranking may have to be reconsidered. In particular, the agglomeration status of MWCNTs in these various studies might be different. In our study, MWCNTs were stabilized by coating with GA or HA. This procedures lead to highly stable MWCNT suspensions, with no detectable agglomeration for several months. MWCNT suspensions used for plant exposure were free of agglomerates, and no MWCNT agglomerates were observed in plant tissues. In the study by Khodakovskaya *et al*., MWCNTs were not coated and a mild acidic treatment ensured their stability in exposure suspensions. The authors however observe MWCNT agglomerates in plant tissues. In the study by Lin *et al*. MWCNTs were sonicated at 8 W for 30 min and coated with natural organic matter. MWCNTs precipitated slightly after one day, suggesting that the suspension was unstable. In plant tissues the authors observe some MWCNT agglomerates. Agglomeration status surely influences MWCNT uptake by plant roots. Indeed in our experiments MWCNTs prepared in GA were accumulated more than MWCNTs prepared in HA. HA has been described as decreasing the zeta potential of silver NPs, leading to higher repulsion force that can limit physical contact between NPs and the surface of exposed cells (Chen *et al.*, 2011). This would explain lower plant accumulation when MWCNTs are covered with HA. HA has also been described as creating a network around NPs leading to large agglomerates containing both HA clusters and NPs (Bae *et al.*, 2011). If true, this could explain why uptake of MWCNTs dispersed in HA was lower than uptake of MWCNTs dispersed in GA.

Impact of MWCNTs on plant development and physiology

Germination rate, root length, dry biomass and evapotranspiration of wheat (Figure 4A) and rapeseed (Figure 4B) were not affected by exposure to 10-100 mg/L MWCNTs sonicated in GA and diluted in water. Mean germination rate was 66% for wheat and 73% for rapeseed. Mean root length of wheat was 45 mm and 40 mm for rapeseed. Dry biomass was 39 mg and 8 mg for wheat and rapeseed, respectively. Finally, evapotranspiration was 0.9 mL/day for wheat and 0.6 mL/day for rapeseed.

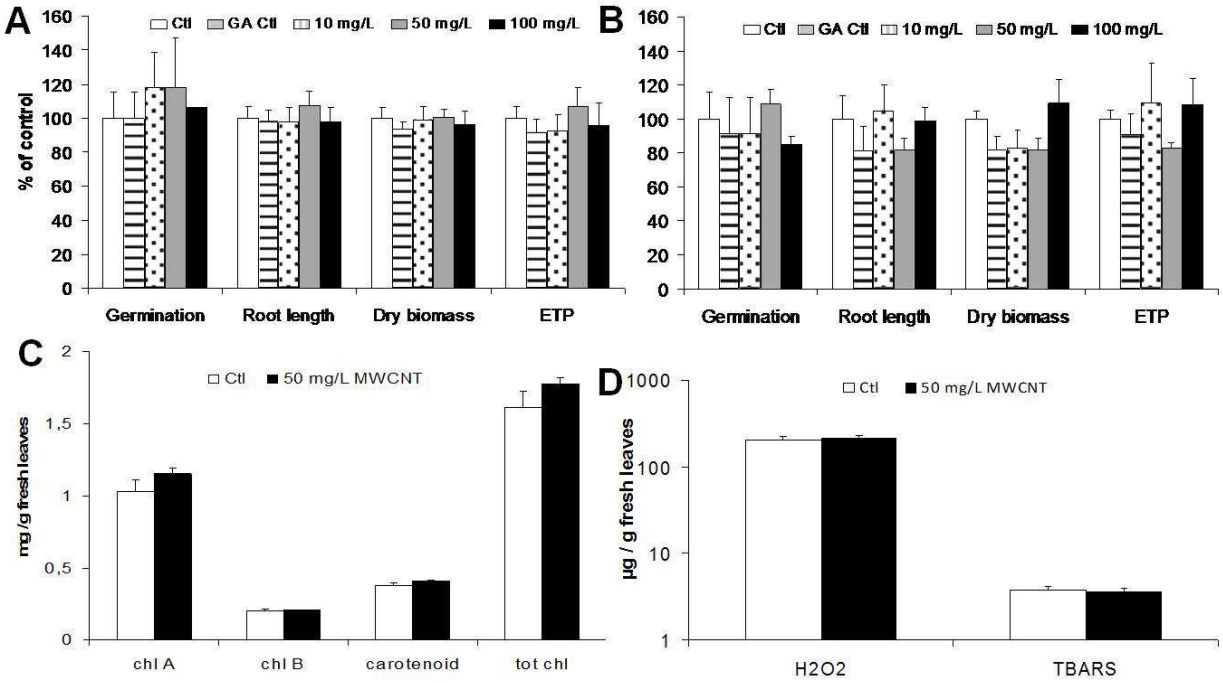


Figure 4. Impact of MWCNTs on plant development and physiology. Seeds of wheat (A) and rapeseed (B) were germinated in 0, 10, 50 or 100 mg/L of MWCNTs. Germination rate and root length were measured after 7 days. Plantlets were then transferred into individual tubes filled with Hoagland solution. Dry biomass and evapotranspiration were measured after 7 days. Chlorophyll A, chlorophyll B and carotenoid contents were assessed on 15-day old wheat plantlets exposed for 7 days to MWCNTs (C). H_2O_2 production and TBARS were measured on wheat leaves of 15-day old plantlets exposed for 24 h to MWCNTs (D).

Regarding MWCNT impact on plant physiology, exposure of wheat plantlets to 50 mg/L MWCNTs did not impact the photosynthetic activity since chlorophyll A, chlorophyll B and carotenoid contents remained unchanged; total chlorophyll content was about 1.7 mg/g fresh leaf (Figure 4C). Finally TBARS content and H_2O_2 production, reflecting oxidative damage to plant cells, were not influenced by MWCNT penetration in plants (Figure 4D): TBARS content was 3.8 µg/g fresh leaf and H_2O_2 production was 7.2 µg/g fresh leaf.

Our results show no influence of MWCNT exposure and uptake on plants. The literature related to MWCNT impact on plant development is contradictory. MWCNTs do not induce much modification in the development of ray grass, radish, rapeseed, lettuce, corn and cucumber, upon exposure to up to 2 g/L of MWCNTs sonicated in water without any dispersing agent (Lin and Xing, 2007). Even at this very high MWCNT concentration, germination is unaffected and root length is increased only for ryegrass (Lin and Xing, 2007). Exposure to 1 g/L of MWCNTs, sonicated in 0.2% SDS and diluted in Hoagland solution, does not impact the germination or root length of zucchini, whereas it decreases its biomass after a 16-day exposure (Lin *et al.*, 2009c). Inversely, MWCNTs prepared in Murashige and Skoog medium at 40 mg/L are accumulated in tomato seeds and induce increased germination rate and biomass of resulting plantlets (Khodakovskaya *et al.*, 2009). The origin of such discrepancies may be explained by the different sensitivities of the various vegetal species. More importantly it may be explained by differences in the preparation of MWCNT suspensions, and consequently different nanotube surface reactivity and dispersion statuses. Agglomeration phenomena may render CNTs less bioavailable for plants; agglomerated CNTs may consequently cause lower impact

on plants than stably dispersed MWCNTs. Unfortunately, no information relative to the dispersion status of the CNTs used is available in the articles cited. In our experiments, MWCNT sonication in GA or in HA led to well-dispersed suspensions which were free of any MWCNT agglomerates. MWCNTs sedimented in the first 24 h of plant exposure, when prepared in Hoagland solution, due to their agglomeration. However, after 24 h plant roots were already covered by MWCNTs (Figure S5). Our hypothesis is that these deposited MWCNTs, together with some still dispersed and non-sedimented MWCNTs may be accumulated in plant roots and transferred to shoot. If MWCNTs are not well-dispersed at the beginning of exposure, which may be the case if sonicated in water without any dispersing agent, they may not be bioavailable. CNT surface reactivity may also modulate their impact on plants. For exposure of tomato, MWCNTs have been purified from catalysts by sonication in acid before being dried, then re-suspended in exposure medium (Khodakovskaya *et al.*, 2009). Acidic treatment has been shown to provoke modification of the CNT surface, in particular side wall openings (Monthioux *et al.*, 2001). These surface modifications may render CNTs more reactive, particularly when they are used without any inert dispersing agent. In our experiments, we prepared CNTs in either GA or HA. Such inert dispersing agents may cover the surface of CNTs and mask surface defects which may be caused by sonication. Note that in environmental conditions, it is probable that MWCNTs get immediately covered with natural organic matter. Coating them with GA or HA is thus appropriate compared to their fate in the environment. Being less reactive, CNTs may thus have less impact on plant development and physiology. The effects reported on tomato (Khodakovskaya *et al.*, 2009) are likely to be the combination of mechanical damages caused by MWCNTs to the seed coat (impact on seed germination and plant development) and chemical damages caused to plant physiology (impact on gene expression). The MWCNTs we used were well-dispersed and their surfaces were covered with inert molecules. Their impact on plant development and physiology may thus have been attenuated as compared to those observed on tomato (Khodakovskaya *et al.*, 2009).

On isolated cells of *Arabidopsis thaliana* (Lin et al., 2009a) and rice (Tan *et al.*, 2009; Tan and Fugetsu, 2007) MWCNTs induce a decrease of chlorophyll content and cell viability as well as increased superoxide dismutase activity and reactive oxygen species production, indicating oxidative stress. We did not observe these effects at the scale of a whole plant. Isolated cells may be more sensitive to pollutants than plantlets. In one of these studies, the authors evoke a self-defence mechanism: in a group of individual cells, those in direct contact with MWCNTs are sacrificed to protect the others (Tan and Fugetsu, 2007). Considering this hypothesis, the most peripheral cells of wheat and rapeseed roots would be much more impacted, and internal cells of roots would be protected. Consequently, TBARS, chlorophyll content and H_2O_2 production in leaves would not be much modulated upon MWCNT exposure.

In summary, we have proved that MWCNTs are taken up by wheat and rapeseed roots, and translocated to the leaves although in very low amounts. In leaves they distribute inhomogeneously and accumulate mainly at the periphery. We provide transfer factor values for both vegetal species, which may be used in a risk assessment perspective. These experiments were performed in hydroponic conditions, and on-going research tends to show that the presence of soil particles would further decrease MWCNT accumulation in plants. In the exposure conditions we used – MWCNTs dispersed by sonication in aqueous solutions of GA or HA – MWCNT impact on plant development and physiology was undetectable.

Acknowledgements: this work was funded by the region Ile-de-France through the framework C'nano Ile-de-France. The region Ile-de-France also provided financial support for the acquisition of the SEM-FEG. C. Larue was supported by a fellowship from the ADEME and CEA. This work was performed within the framework of the iCEINT research consortium (International Consortium for Environmental Implication of NanoTechnology). The authors would like to thank O. Rabouille and B. Verhaeghe (CEA-DEN-LM2E) for SEM and TEM analyses on $MW^{14}CNT$ and A. Simon-Deckers for TEM imaging of CNT suspension. Authors also thank Donald White for the English proofreading.

2. Influence du diamètre extérieur des NTC et de leurs propriétés de surface sur les effets générés sur le blé et le colza

2.1. Impact sur le développement du blé et du colza

Nous avons précédemment montré que l'exposition à des MWCNTs (Ø54 nm) n'induisait pas de modulation du développement du blé et du colza.

Pour mettre en évidence un effet lié au diamètre extérieur des NTC, nous avons testé l'impact de NTC ayant un diamètre extérieur plus petit : les DWCNTs (Ø2 nm).

Nous disposons de 2 types de DWCNTs différant par leur traitement de surface post-synthèse. Ces expériences ont donc également été l'occasion de tester l'influence des caractéristiques de surface. En effet, les DWCNTs bruts sont les NTC brut de synthèse et les DWCNTs oxydés ont subi un traitement acide post-synthèse. Il en résulte des NTC portant des groupements oxygénés en surface les rendant plus hydrophiles et donc plus faciles à mettre en suspension.

Cette étude a été menée à la fois sur le blé (Figure 109) et sur le colza (Figure 110) exposés dans l'eau ultrapure.

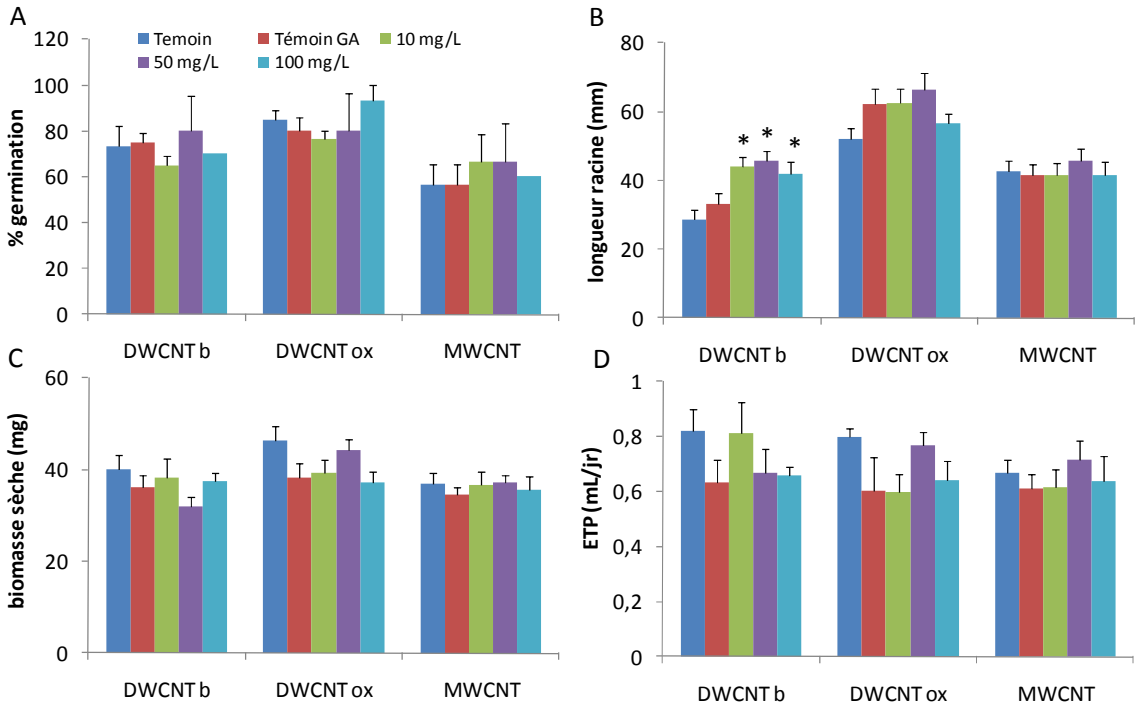


Figure 109 : Impact des NTC sur le développement du blé en hydroponie. A. Impact sur la germination. B. Impact sur la longueur des racines. C. Impact sur la biomasse sèche. D. Impact sur l'ETP.

Le taux de germination (Figure 109A), la biomasse (Figure 109C) et l'ETP (Figure 109D) ne varient pas en réponse à une exposition aux NTC, quelles que soient leurs caractéristiques physico-chimiques. En revanche, nous avons observé une augmentation significative de l'élongation racinaire lors d'une exposition aux DWCNTs bruts (Figure 109B). Les racines sont alors plus longues de 53, 60 et 47% lorsque la concentration en DWCNTs bruts est de 10, 50 et 100 mg/L.

Les mêmes effets ont été observés sur le colza : aucun changement du taux de germination (Figure 110A), de la biomasse (Figure 110C) et de l'ETP (Figure 110D). En revanche, les DWCNTs bruts induisent une élongation racinaire significative d'environ 50% chez le colza à 10 et 50 mg/L (Figure 110B). Dans ce cas, on note également une tendance à l'induction de l'élongation racinaire après une exposition aux DWCNTs oxydés, mais celle-ci n'est pas statistiquement significative.

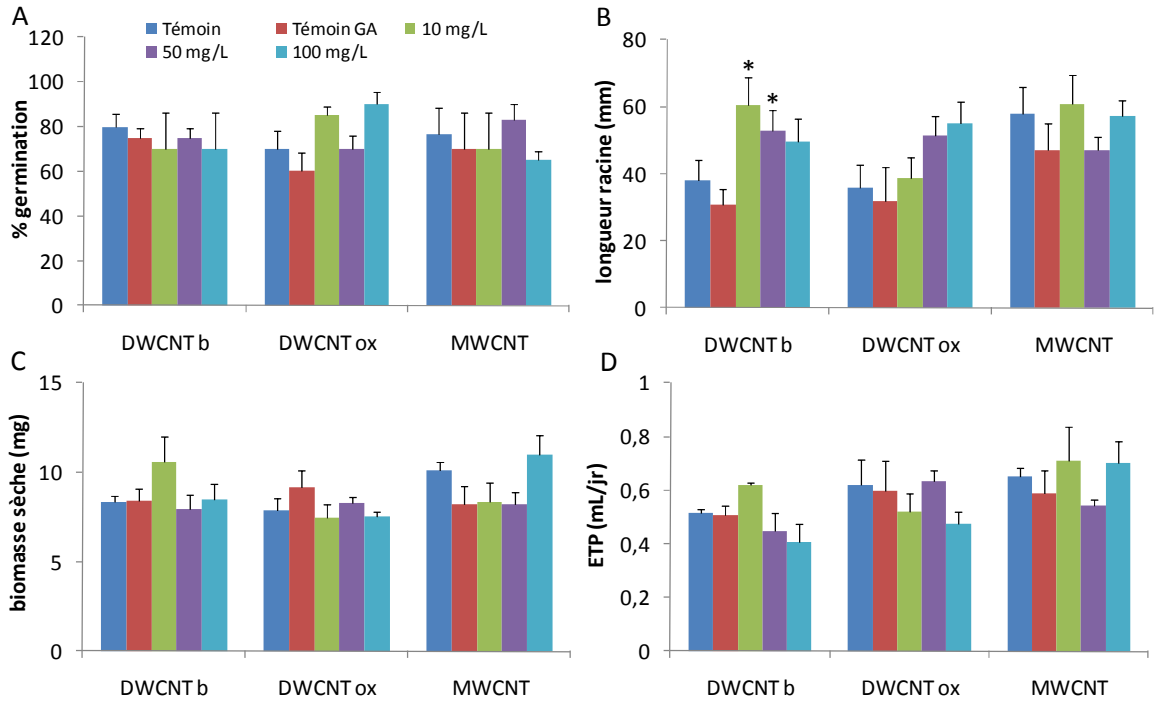


Figure 110 : Impact des NTC sur le développement des graines de colza en hydroponie. A. Impact sur la germination. B. Impact sur la longueur des racines. C. Impact sur la biomasse sèche. D. Impact sur l'ETP.

2.2. Impact sur la physiologie du blé

L'influence des caractéristiques physico-chimiques des NTC a également été évaluée sur le contenu en pigments chlorophylliens du blé après une exposition à 50 mg/L de DWCNTs bruts, DWCNTs oxydés et MWCNTs (Figure 111).

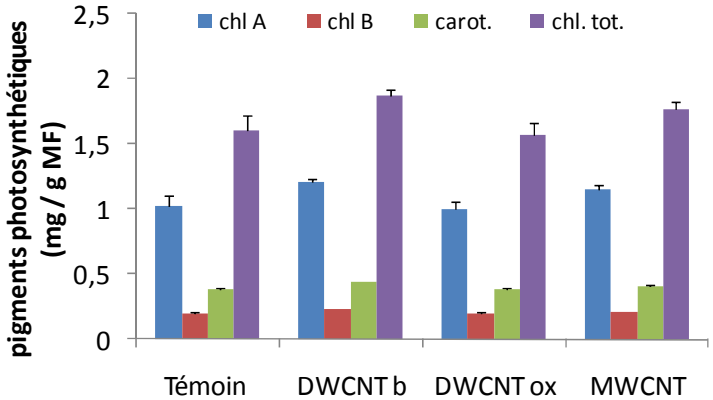


Figure 111 : Contenu en pigments photosynthétiques dans les feuilles de blé de plantules exposées à 50 mg/L de différents NTC *(chl A chlorophylle A, chl B chlorophylle B, carot. caroténoïdes, chl tot chlorophylle total)*.

Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence concernant le contenu en pigments photosynthétiques dans les feuilles de blé après exposition aux NTC, quelles que soient leurs caractéristiques physico-chimiques. Le contenu moyen en chlorophylle A est de 1,099 mg/g MF, en chlorophylle B 0,207 mg/g MF et en caroténoïdes 0,401 mg/g MF, soit un contenu en chlorophylle total moyen de 1,690 mg/g MF.

2.3. Discussion des résultats

Nos résultats concernant l'impact des NTC sur les végétaux ont montré que les MWCNTs s'accumulaient dans les feuilles du blé et du colza. Ils sont principalement observés à l'intérieur des cellules, regroupés dans les vacuoles. Une exposition racinaire du blé et du colza à des NTC n'a que peu d'effets sur le développement et la physiologie de ces végétaux. En effet, seule la longueur des racines est accrue lorsque le blé et le colza sont exposés aux DWCNTs bruts.

On peut donc conclure de cette étude que l'impact des NTC sur les végétaux dépend de leurs **caractéristiques physico-chimiques**. En effet, nous n'avons observé des effets que lorsque les plantules étaient exposées aux NTC ayant le plus petit diamètre (2 nm). Le **diamètre extérieur** des NTC est donc un paramètre important pour expliquer leur impact sur le développement des plantes.

Ce résultat obtenu sur les NTC va dans le même sens que ceux obtenus sur les NPs de TiO_2. Les seuls effets visibles après une exposition aux NPs de TiO_2 étaient une induction de l'élongation racinaire pour les NPs ayant un diamètre ≤20 nm. De même, tous les autres paramètres (germination, biomasse, ETP, pigments photosynthétiques et stress oxydant) restaient inchangés.

Le diamètre extérieur seul n'explique pas l'induction de l'élongation racinaire car les effets sont significatifs uniquement après exposition à des DWCNTs bruts, cela implique donc que les **propriétés de surface** jouent également un rôle dans ce phénomène.

L'étude de ces deux nanomatériaux très différents mène aux mêmes conclusions : une plus grande réactivité des nanomatériaux de diamètre inférieur à 20 nm vis-à-vis des végétaux. Ces résultats suggèrent donc un mode d'action similaire.

Néanmoins, il existe une différence notable entre ces deux nanomatériaux : la quantité accumulée dans les tissus végétaux. En effet, après une exposition à des NPs de TiO_2, les concentrations s'expriment en mg Ti/kg MS alors que dans le cas des NTC, on parle de µg NTC/kg MS. Cette différence peut facilement s'expliquer par la différence de forme. Les NPs de TiO_2 sont sphériques, donc toutes leurs dimensions sont inférieures à 100 nm. A l'inverse, les NTC sont sous forme de fibre. Leur diamètre est inférieur à 100 nm mais leur longueur est d'ordre micrométrique. L'internalisation de ces fibres n'est certainement possible que lorsque les NTC sont positionnés perpendiculairement à la racine, comme le montre nos images en MEB. De ce fait, l'accumulation est beaucoup plus réduite.

Dans la littérature, plusieurs équipes ont mis en évidence des effets contradictoires concernant l'impact des NTC sur le développement en fonction de l'espèce végétale. Ainsi, l'oignon, le concombre, la tomate, le ray-grass et le pois chiche voient la longueur de leurs racines et/ou leur biomasse accrues après une exposition à des NTC (Canas *et al.*, 2008; Khodakovskaya *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011; Lin and Xing, 2007; Tripathi *et al.*, 2011). A l'inverse, la laitue et la courgette subissent des diminutions de biomasse et d'élongation racinaire (Canas *et al.*, 2008;

Stampoulis *et al.*, 2009). Enfin, le développement de la carotte, du chou, du radis, du colza et du maïs n'est pas perturbé après exposition à des NTC (Lin and Xing, 2007; Canas *et al.*, 2008). Mais certains végétaux exhibent des comportements différents selon les études : tomate, laitue et concombre. Ainsi, dans ces études, les types de NTC varient du SWCNT au MWCNT. Aucune étude n'a été réalisée sur les végétaux avec des DWCNTs. Les différences de comportement constatées sur ces trois végétaux peuvent peut-être s'expliquer par la différence de **diamètre extérieur** des nanotubes testés. Par exemple, dans l'étude de Lin et Xing, les NTC testés sont des MWCNTs de diamètre 10 à 20 nm. Ces NTC n'ont pas d'effet sur l'élongation racinaire de la laitue et du concombre. En revanche, les auteurs observent une augmentation ou une diminution de la longueur des racines de la laitue et du concombre lorsqu'ils sont exposés à des SWCNTs de diamètre 8 nm (Canas *et al.*, 2008). Les NTC de plus petits diamètres seraient donc plus réactifs, ce qui va dans le sens de nos observations.

Un autre paramètre pouvant expliquer les différences de phytotoxicité est le milieu d'exposition. En effet, la longueur des racines de tomates exposées à des NTC dans un gel ne varie pas par rapport aux racines témoins non exposées (Khodakovskaya *et al.*, 2009). A l'inverse, les racines de tomates exposées à des NTC en hydroponie sont plus courtes que celles des plantules témoins non exposées (Canas *et al.*, 2008). Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ce phénomène. Il est possible que le gel limite les contacts entre NTC et racines, limitant également leur biodisponibilité et leurs effets.

Enfin, une dernière étude sur l'influence du diamètre des NTC a été réalisée sur des végétaux cultivés sur des boues de station d'épuration (Oleszczuk *et al.*, 2011). D'après les auteurs, le diamètre des MWCNTs (10 ou 60 nm) module leurs effets toxiques. Cependant, les résultats varient également en fonction de la composition de la boue, de la durée de contact entre la boue et les NTC et du végétal considéré. Il est donc difficile de relier de façon catégorique le diamètre extérieur des NTC avec leur phytotoxicité.

L'influence des **caractéristiques de surface** des NTC a été peu étudiée. Le but de la fonctionnalisation de la surface des NTC est de les rendre plus facilement dispersables dans les milieux biologiques. Dans l'étude de Canas et al., les auteurs concluent que les SWCNTs brut de synthèse affectent plus le développement des végétaux que les SWCNTs fonctionnalisés (Canas *et al.*, 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons mis en évidence lors de ce travail.

3. Synthèse du chapitre

SYNTHESE DU CHAPITRE

- Accumulation des NTC dans les végétaux
  - Internalisation racinaire et transfert aérien des MWCNTs (Ø 54 nm)
  - Répartition préférentielle
  - Concentration en µg NTC/kg MS
  - Facteur de transfert du milieu aux feuilles très faible ($<3\times10^{-5}$)

- Phytotoxicité des NTC envers les végétaux
  - Induction de l'élongation racinaire pour un type de NTC (DWCNT brut)
  - Aucun effet sur la germination, la biomasse sèche, l'ETP, le contenu en pigments photosynthétiques, en TBARS et en H_2O_2

- Influence des caractéristiques physico-chimiques
  - Diamètre extérieur influence la phytotoxicité
  - Propriétés de surface influence la phytotoxicité

- Influence de l'espèce végétale
  - Accumulation plus importante dans le colza que dans le blé
  - Comportement identique vis-à-vis de la phytotoxicité des NTC

CONCLUSION

Dans un premier temps, rappelons que le but de ces travaux était d'étudier l'**accumulation** et la **phytotoxicité** des nanomatériaux sur deux **espèces végétales** en fonction de leurs **caractéristiques physico-chimiques.**

- Accumulation des nanomatériaux dans les deux types de végétaux :

Nous avons mis en évidence l'accumulation ainsi que le transfert des 2 types de nanomatériaux étudiés sur les 2 plantes testées.

En effet, les NPs de TiO_2 de diamètre nominal inférieur à 35 nm sont accumulées dans les racines lors d'une exposition en hydroponie. Les NPs de diamètre nominal inférieur ou égal à 25 nm migrent ensuite par voie symplasmique et apoplasmique du parenchyme au cylindre central des racines. Puis, elles sont transférées vers les parties aériennes par les vaisseaux conducteurs de la sève brute sous l'effet de l'ETP. De là, elles se répartissent de façon homogène dans les feuilles sans localisation préférentielle. Ces NPs conservent leur structure cristalline tout au long du transfert.

Les NPs de TiO_2 (25 nm) sont également accumulées dans les racines lors d'une exposition sur sol sableux. La quantité accumulée dépend du contenu en argile du sol : plus le sol est argileux moins les NPs sont biodisponibles.

Dans ces deux cas, les quantités de NPs accumulées dans les plantes sont de l'ordre du mg à la centaine de mg Ti /kg MS.

Enfin, l'accumulation des NPs de TiO_2 (12 nm) a également été constatée après une exposition par voie foliaire par dépôt humide.

En ce qui concerne les NTC, seule l'accumulation des MWCNTs (Ø54 nm) a été investiguée montrant que ces NTC sont transférés en faible quantité du milieu d'exposition (en hydroponie) aux feuilles avec une répartition préférentielle à la périphérie des feuilles et vers les feuilles en développement. Au niveau ultrastructural, les NTC n'ont été observés qu'à l'intérieur des cellules, où ils semblent stockés dans les vacuoles.

Les quantités de NTC accumulées dans les feuilles de blé et de colza sont de l'ordre de quelques centaines de µg NTC/kg MS.

- Très faible phytotoxicité des nanomatériaux :

Un des résultats remarquables de cette étude est que les deux végétaux ont répondu de la même façon aux deux types de nanomatériaux.

Parmi l'ensemble des tests effectués et visant à caractériser les effets phytotoxiques des nanomatériaux, seule la longueur des racines s'est avérée être un critère sensible. Les NPs de TiO_2 et les NTC de faible diamètre nominal (≤20 nm) induisent une élongation racinaire chez le blé et le colza.

Les autres tests ayant pour objet de mettre en évidence un impact des nanomatériaux sur le développement des végétaux (taux de germination, biomasse sèche, ETP) ou sur leur physiologie (pigments photosynthétiques, H_2O_2, TBARS, nutrition hydrominérale) n'ont montré aucun changement de comportement des végétaux suite à une exposition aux NPs de TiO_2 ou aux NTC.

Ces travaux suggèrent donc que les NPs de TiO_2 et les NTC n'induisent pas d'effets phytotoxiques aigus sur les deux modèles végétaux que nous avons étudiés.

- Réponse différente des deux espèces végétales :

Les expériences d'accumulation et de phytotoxicité ont été plus approfondies sur le blé que sur le colza. Néanmoins, les résultats obtenus montrent peu de différences de comportement entre ces deux végétaux. Le seul paramètre morphologique ou physiologique variant suite à l'exposition aux nanomatériaux est la longueur des racines et ce, quelle que soit l'espèce végétale considérée. Du point de vue de l'accumulation, on note que le colza concentre le titane et les NTC de façon plus importante que le blé. Cette plante est connue pour ses propriétés d'hyperaccumulatrice des métaux lourds ; il est possible que cette propriété soit extrapolable aux polluants à l'état nanoparticulaire.

- Corrélation accumulation et impact des nanomatériaux/caractéristiques physico-chimiques :

Tout au long de cette étude, nous avons pu corréler l'impact et l'accumulation des nanomatériaux avec leurs caractéristiques physico-chimiques.

Le critère le plus discriminant est le diamètre nominal. En effet, il semble conditionner tous les effets observés. Selon nos travaux, aucune accumulation racinaire n'a été détectée au dessus d'un diamètre des nanomatériaux de 54 nm et aucun effet au dessus de 20 nm. D'après ces travaux, on peut donc conclure que l'utilisation de NPs de TiO_2 et de NTC de diamètre supérieur à 60 nm présenterait peu de danger quant à la contamination des végétaux.

Dans de moindres proportions, le diamètre hydrodynamique module également le transfert des NPs vers les parties aériennes. Plus les NPs sont agglomérées dans le milieu, plus le transfert sera réduit.

Les propriétés de surface des NTC peuvent également moduler leur impact sur l'élongation racinaire. Les DWCNTs fonctionnalisés (oxydés) induisent moins d'effets que leurs homologues bruts de synthèse.

La phase cristalline des NPs de TiO_2, anatase ou rutile, ne module ni l'accumulation des NPs, ni leur impact sur les végétaux.

Tous ces résultats ont été rassemblés dans la Figure 112.

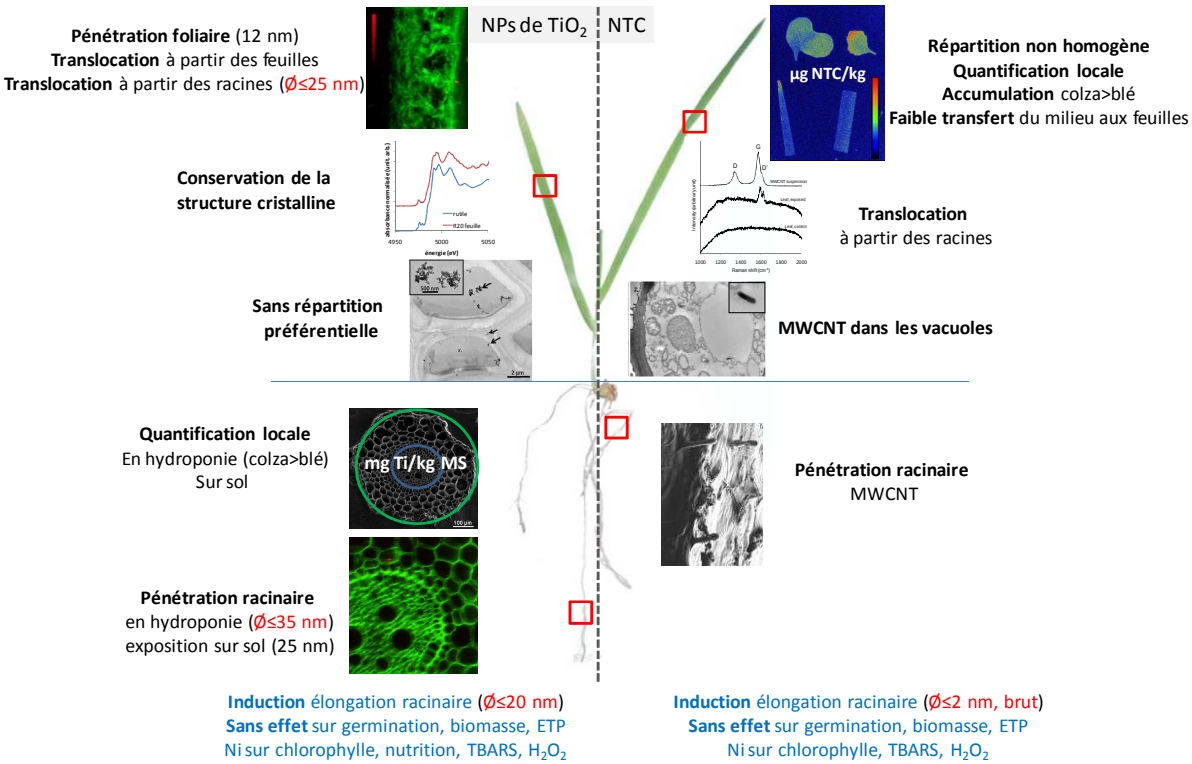


Figure 112 : Résumé graphique des résultats de la thèse (en noir, l'accumulation des nanomatériaux, en bleu, leur phytotoxicité, en rouge, l'influence des caractéristiques physico-chimiques).

Du fait du positionnement du laboratoire, à l'interface entre physique et biologie (Direction des Sciences de la Matière/ Institut Rayonnement Matière de Saclay), nous avons eu l'opportunité d'utiliser de nombreuses techniques de pointe, peu exploitées en biologie. Nos résultats sont originaux et innovants dans le domaine de l'écotoxicologie des nanomatériaux. Nous avons ainsi pu apporter des connaissances toutes nouvelles concernant par exemple la quantification locale du titane dans les racines, la spéciation de ce dernier au sein des tissus végétaux ou encore la répartition du titane et des NTC à l'échelle de la plante.

Peu de données étaient disponibles dans la littérature lorsque nous avons initié ces travaux sur l'impact des nanomatériaux sur les végétaux. Seulement 24 articles étaient disponibles dont 13 dataient de 2007. En trois ans, ce nombre d'articles est passé à une centaine. Si beaucoup de progrès ont été fait, beaucoup de données manquent encore.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons mis en évidence la corrélation entre le diamètre nominal des nanomatériaux et leurs effets et leur accumulation dans les végétaux. Dans un premier temps, il serait intéressant de confirmer ces résultats en examinant l'impact de NPs de TiO_2 de taille comprise entre 35 et 140 nm. En effet, l'internalisation a été démontrée jusqu'à 35 nm mais notre gamme ne comprenait pas de NPs entre 35 et 140 nm (diamètre auquel aucune internalisation n'est constatée). Les MWCNTs sont internalisés alors que leur diamètre est de 54 nm, il est donc possible que le diamètre limitant l'internalisation des NPs de TiO_2 soit également légèrement supérieur à 35 nm. Cette influence du diamètre nominal a été reliée à une plus grande réactivité des très petites NPs (Auffan *et al.*, 2009). Pour confirmer cette hypothèse, les futures études devraient également

inclure des NPs de diamètre inférieur à 12 nm. On pourrait ainsi voir s'il existe un effet proportionnel entre le diamètre nominal et l'induction racinaire et l'accumulation des NPs.

Nous n'avons mis en évidence que très peu d'impact des nanomatériaux sur le développement et la physiologie des végétaux. Néanmoins, il serait intéressant de considérer des marqueurs de stress plus sensibles. L'étude des effets génotoxiques grâce au test comètes et au test des micronoyaux peut en être un exemple. Des études transcriptomiques et protéomiques pourraient également révéler des changements de comportements des plantes liés à une exposition aux nanomatériaux.

Une question reste également sans réponse à ce jour : quels sont les mécanismes d'internalisation des NPs dans les plantes ? Pour y répondre, il faudrait étudier de façon précise les interactions entre la surface des racines et les NPs ainsi que l'expression des gènes. Par exemple, une équipe de chercheurs a constaté une surexpression du gène régulant les aquaporines (Khodakovskaya *et al.*, 2011). Les aquaporines, canaux responsables de l'accumulation d'eau dans les plantes, pourraient également véhiculer les nanomatériaux.

Enfin, une autre piste de recherche serait de se rapprocher encore plus des conditions environnementales. Les résultats obtenus, lors de notre étude, après une exposition sur sol sont très préliminaires et mériteraient d'être approfondis. Il serait judicieux d'essayer de localiser les NPs dans les tissus par d'autres techniques en utilisant par exemple des NPs fluorescentes. Il serait également intéressant de conduire des expériences sur sols avec de plus faibles doses de nanomatériaux et sur des durées d'exposition beaucoup plus longues mimant ainsi une contamination chronique de l'environnement. On pourrait alors vérifier si les effets visibles en hydroponie sont reproductibles en conditions réelles. En outre, ce type d'étude aurait aussi l'avantage de permettre de détecter un transfert des nanomatériaux vers les graines ou les fruits qui sont les organes consommables des végétaux. La mise en place de mésocosmes est également un moyen d'étudier le comportement des nanomatériaux au sein d'écosystèmes. On accède alors à des informations concernant les interactions entre le biotope et la biocénose. Ce type de projet est développé dans le cadre de l'ANR Mesonnet portée par le groupement de recherche iCEINT.

Pour finir :

"We tend to overestimate the effect of a technology in the short run and underestimate the effect in the long run."

Loi d'Amara

Toute nouvelle technologie qui apparait suscite à la fois de l'enthousiasme mais également des craintes. Les nanotechnologies ne font pas exception à la règle. Les craintes, pour l'instant, sont vives comme en témoignent les débats nationaux organisés entre 2009 et 2010. Néanmoins, utilisées à bon escient, les nanotechnologies représentent un potentiel énorme d'innovations, notamment en médecine. Il convient de déterminer le rapport bénéfice sur risque, c'est-à-dire juger de quels risques nous sommes prêts à envisager pour quels bénéfices. Un développement raisonné des nanotechnologies est donc indispensable, en parallèle d'études toxicologiques et écotoxicologiques pertinentes et fiables.

LEXIQUE

ADN	Acide DesoxyriboNucléique
AH	Acide Humique
BET	Brunauer-Emmett-Teller
CIRIMAT	Centre Interuniversitaire de Recherche Ingénierie Materiaux
CCVD	Catalyst Chemical Vapor Deposition
CEC	Capacité d'Echange Cationique
cps	coups
DLS	Dynamic Light Scattering
DRX	Diffraction des rayons X
DWCNT	Double-Walled Carbon Nanotube
EC_{50}	Effective concentration 50%: concentration de toxique qui provoque une réponse à mi-chemin entre le niveau basal et le maximum de réponse.
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
GA	Gomme Arabique
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer
MDA	MalonDiAldéhyde
MEB (SEM)	Microscop(i)e Electronique à Balayage
MET (TEM)	Microscop(i)e Electronique à Transmission
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotube
MS	Matière Sèche
NP(s)	Nanoparticule(s)
NTC	Nanotube de carbone
pI	Point Isoélectrique
PIXE	Particle Induced X-ray Emission
pt	point
RBS	Rutherford Backscaterring Spectroscopy
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
SIS2M	Service Interdisplinaire des Systèmes Moléculaires et des Matériaux
SPAM	Service des Photons, Atomes et Molécules
STIM	Scanning Transmission Ion Microscopy
TBARS	ThioBarbituric Acid Reactive Species
TiO_2	Dioxyde de titane
XANES	X-ray Absorption Near-Egde Structure
XAS	X-ray Absorption Spectroscopy
XRF	X-Ray Fluorescence
ZVI	Zero Valent Iron
Ø	Diamètre

BIBLIOGRAPHIE

A

Abrol, Y. &Ingram, K. (1995).Les effets de la hausse des températures diurnes et nocturnes sur la croissance et les rendements de certaines plantes cultivées. In *Changements du climat et production agricole. Effets directs et indirects du changement des processus hydrologiques, pédologiques et physiologiques des végétaux* 472 (Ed FAO). Paris.

Adams, L. K., Lyon, D. Y. &Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions. *Water Research* 40(19): 3527-3532.

AFSSET (2010).Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement.

Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M. &Rowe, J. J. (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in Drosophila melanogaster. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242(3): 263-269.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. &Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24(12): 1337-1344.

Alimohammadi, M., Xu, Y., Wang, D. Y., Biris, A. S. &Khodakovskaya, M. V. (2011). Physiological responses induced in tomato plants by a two-component nanostructural system composed of carbon nanotubes conjugated with quantum dots and its in vivo multimodal detection. *Nanotechnology* 22(29).

Allen, B. L., Kichambare, P. D., Gou, P., Vlasova, II, Kapralov, A. A., Konduru, N., Kagan, V. E. &Star, A. (2008). Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. *Nano Lett* 8(11): 3899-3903.

Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K. &Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO(2) to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata. *Science of the Total Environment* 407(4): 1461-1468.

Asharani, P. V., Yi, L. W., Gong, Z. Y. &Valiyaveettil, S. (2011). Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 5(1): 43-54.

Asli, S. &Neumann, P. M. (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell and Environment* 32(5): 577-584.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P. &Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nano* 4(10): 634-641.

B

Bae, E., Park, H. J., Yoon, J., Kim, Y., Choi, K. &Yi, J. (2011). Bacterial uptake of silver nanoparticles in the presence of humic acid and AgNO3. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28(1): 267-271.

Baek, Y. W. &An, Y. J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb(2)O(3)) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. *Science of the Total Environment* 409(8): 1603-1608.

Bai, W., Zhang, Z. Y., Tian, W. J., He, X., Ma, Y. H., Zhao, Y. L. &Chai, Z. F. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12(5): 1645-1654.

Bali, R. &Harris, A. T. (2010). Biogenic Synthesis of Au Nanoparticles Using Vascular Plants. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49(24): 12762-12772.

Bali, R., Siegele, R. &Harris, A. (2010a). Biogenic Pt uptake and nanoparticle formation in <i>Medicago sativa</i> and <i>Brassica juncea</i>. *Journal of Nanoparticle Research* 12(8): 3087-3095.

Bali, R., Siegele, R. &Harris, A. T. (2010b). Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in Medicago sativa and Brassica juncea. *Chemical Engineering Journal* 156(2): 286-297.

Battke, F., Leopold, K., Maier, M., Schmidhalter, U. &Schuster, M. (2008). Palladium exposure of barley: uptake and effects (vol 10, pg 272, 2008). *Plant Biology* 10(3): 413-413.

Belmonte, T. (2010). Dépôt chimique à partir d'une phase gazeuse. *Techniques de l'ingénieur*.

Berger, P. &Revel, G. (2005). Microsonde Nucléaire – Principe et appareillage. *Techniques de l'ingénieur*.

Bhattacharya, P., Lin, S. J., Turner, J. P. &Ke, P. C. (2010). Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C* 114(39): 16556-16561.

Bian, S. W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T. &Grassian, V. H. (2011). Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. *Langmuir* 27(10): 6059-6068.

Birbaum, K., Brogioli, R., Schellenberg, M., Martinoia, E., Stark, W. J., Gunther, D. &Limbach, L. K. (2010). No Evidence for Cerium Dioxide Nanoparticle Translocation in Maize Plants. *Environmental Science & Technology* 44(22): 8718-8723.

Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M. &Kahru, A. (2010). Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158(1): 41-47.

Bourrel, F. &Courrière, P. (2003). Radionucléides-Application: biologie moléculaire. *Techniques de l'ingénieur*.

Brar, S. &Verma, M. (2011). Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry* 30(1): 4-17.

Bratby, J. (2006). *Coagulation and Floculation in water and wastewater treatment.*

Braydich-Stolle, L., Schaeublin, N., Murdock, R., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J. &Hussain, S. (2009). Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research* 11(6): 1361-1374.

Brayner, R., Dahoumane, S. A., Yepremian, C., Djediat, C., Meyer, M., Coute, A. &Fievet, F. (2010). ZnO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Ecotoxicological Studies. *Langmuir* 26(9): 6522-6528.

Brayner, R., Sicard, C., Ben Sassi, H., Beji, Z., Yepremian, C., Coute, A. &Fievet, F. (2011). Design of ZnO nanostructured films: Characterization and ecotoxicological studies. *Thin Solid Films* 519(10): 3340-3345.

Broll, N. (1996). Caractérisation de solides cristallisés par diffraction des rayons X. *Techniques de l'ingénieur*.

Brunauer, S., Emmett, P. &Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60: 309-319.

Butler, O., Cook, J., Harrington, C., Hill, S., Rieuwerts, J. &Miles, D. (2011). Atomic spectrometry update. Environmental analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26: 250-286.

C

Campbell (1995). *Biologie.*

Campbell, J. L., Hopman, T. L., Maxwell, J. A. &Nejedly, Z. (2000). The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 170(1-2): 193-204.

Canas, J. E., Long, M. Q., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M. X., Ambikapathi, R., Lee, E. H. &Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1922-1931.

Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., Canonico, B., Fantinati, A., Marcornini, A. &Pojana, G. (2008). Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environment International* 34(8): 1114-1119.

Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A. &Pojana, G. (2010a). In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO(2), SiO(2)) on Mytilus hemocytes. *Aquatic Toxicology* 96(2): 151-158.

Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A. &Pojana, G. (2010b). Biomarkers in Mytilus galloprovincialis exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO(2), Nano-SiO(2)). *Aquatic Toxicology* 100(2): 168-177.

Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D. &Delmer, D. P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* 205(4411): 1144-1147.

Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Geri, C. &Cremonini, R. (2011). The effects of nano-TiO(2) on seed germination, development and mitosis of root tip cells of Vicia narbonensis L. and Zea mays L. *Journal of Nanoparticle Research* 13(6): 2443-2449.

Castro, C., Pinault, M., Coste-Leconte, S., Porterat, D., Bendiab, N., Reynaud, C. &Mayne-L'Hermite, M. (2010). Dynamics of catalyst particle formation and multi-walled carbon nanotube growth in aerosol-assisted catalytic chemical vapor deposition. *Carbon* 48(13): 3807-3816.

Caude, M. &Jardy, A. (1994). Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. *Techniques de l'ingénieur*.

Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J. &Gu, M. B. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes). *Aquatic Toxicology* 94(4): 320-327.

Chatterjee, T., Chakraborti, S., Joshi, P., Singh, S. P., Gupta, V. &Chakrabarti, P. (2010). The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the Vibrio cholerae ToxR protein. *Febs Journal* 277(20): 4184-4194.

Chen, J. W., Xiu, Z. M., Lowry, G. V. &Alvarez, P. J. J. (2011). Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Research* 45(5): 1995-2001.

Chen, L. X., Rajh, T., Wang, Z. &Thurnauer, M. C. (1997). XAFS Studies of Surface Structures of TiO2 Nanoparticles and Photocatalytic Reduction of Metal Ions. *The Journal of Physical Chemistry B* 101(50): 10688-10697.

Chen, L. X., Sabatini, D. A. &Kibbey, T. C. G. (2010a). Retention and release of TiO(2) nanoparticles in unsaturated porous media during dynamic saturation change. *Journal of Contaminant Hydrology* 118(3-4): 199-207.

Chen, R., Ratnikova, T. A., Stone, M. B., Lin, S., Lard, M., Huang, G., Hudson, J. S. &Ke, P. C. (2010b). Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. *Small* 6(5): 612-617.

Chinnapongse, S. L., MacCuspie, R. I. &Hackley, V. A. (2011). Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Science of the Total Environment* 409(12): 2443-2450.

Choi, H. C., Ahn, H.-J., Jung, Y. M., Lee, M. K., Shin, H. J., Kim, S. B. &Sung, Y.-E. (2004). Characterization of the Structures of Size-Selected TiO2 Nanoparticles Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 58(5): 598-602.

Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K., Yi, J. &Ryu, D. Y. (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* 100(2): 151-159.

Chu, W. K., Mayer, J. W. &Nicolet, M. A. (1978). *Backscattering Spectroscopy.* New York.

Chung, H., Son, Y., Yoon, T. K., Kim, S. &Kim, W. (2011). The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 569-575.

Coleman, J. G., Johnson, D. R., Stanley, J. K., Bednar, A. J., Weiss, C. A., Boyd, R. E. &Steevens, J. A. (2010). Assessing the Fate and Effects of Nano Aluminum Oxide in the Terrestrial Earthworm, Eisenia Fetida. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(7): 1575-1580.

Collins, R. N., Bakkaus, E., Carriere, M., Khodja, H., Proux, O., Morel, J. L. &Gouget, B. (2010). Uptake, Localization, and Speciation of Cobalt in Triticum aestivum L. (Wheat) and Lycopersicon esculentum M. (Tomato). *Environmental Science & Technology* 44(8): 2904-2910.

Cornelis, G., Kirby, J. K., Beak, D., Chittleborough, D. &McLaughlin, M. J. (2010). A method for determination of retention of silver and cerium oxide manufactured nanoparticles in soils. *Environmental Chemistry* 7(3): 298-308.

Cornelis, G. C. G., Ryan, B., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Beak, D. &Chittleborough, D. (2011). Solubility and Batch Retention of CeO(2) Nanoparticles in Soils. *Environmental Science & Technology* 45(7): 2777-2782.

Corredor, E., Testillano, P. S., Coronado, M. J., Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Marquina, C., Ibarra, M. R., de la Fuente, J. M., Rubiales, D., Perez-De-Luque, A. &Risueno, M. C. (2009). Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *Bmc Plant Biology* 9.

Cotae, V. &Creanga, L. (2005). LHC II system sensitivity to magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 289: 459-462.

Croteau, M. N., Dybowska, A. D., Luoma, S. N. &Valsami-Jones, E. (2011). A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5(1): 79-90.

D

Dabrunz, A., Duester, L., Prasse, C., Seitz, F., Rosenfeldt, R., Schilde, C., Schaumann, G. E. &Schulz, R. (2011). Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO(2) Nanoparticle Toxicity in Daphnia magna. *Plos One* 6(5).

Darlington, T. K., Neigh, A. M., Spencer, M. T., Nguyen, O. T. &Oldenburg, S. J. (2009). Nanoparticle Characteristics Affecting Environmental Fate and Transport through Soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(6): 1191-1199.

Dasari, T. P. &Hwang, H. M. (2010). The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *Science of the Total Environment* 408(23): 5817-5823.

Daudin, L., Khodja, H. &Gallien, J. P. (2003). Development of "position-charge-time" tagged spectrometry for ion beam microanalysis. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 210: 153-158.

Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S. C. &Goswami, A. (2011). Entomotoxic effect of silica nanoparticles against Sitophilus oryzae (L.). *Journal of Pest Science* 84(1): 99-105.

Dey, A., Bagchi, B., Das, S., Basu, R. &Nandy, P. (2011). A study on the phytotoxicity of nano mullite and metal-amended nano mullite on mung bean plants. *Journal of Environmental Monitoring* 13(6): 1709-1715.

Dimkpa, C. O. D. C. O., Calder, A., Gajjar, P., Merugu, S., Huang, W. J., Britt, D. W., McLean, J. E., Johnson, W. P. &Anderson, A. J. (2011). Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, Pseudomonas chlororaphis. *Journal of Hazardous Materials* 188(1-3): 428-435.

Doshi, R., Braida, W., Christodoulatos, C., Wazne, M. &O'Connor, G. (2008). Nano-aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environmental Research* 106(3): 296-303.

Doucet, J. &Baruchel, J. (2011). Rayonnement synchrotron et applications. *Techniques de l'ingénieur*.

Dresselhaus, M. &Dresselhaus, G. (Eds) (1982). *Light scattering in solids.* Berlin: Springer.

Dresselhaus, M. S. &Eklund, P. C. (2000). Phonons in carbon nanotubes. *Advances in Physics* 49(6): 705-814.

Du, W. C., Sun, Y. Y., Ji, R., Zhu, J. G., Wu, J. C. &Guo, H. Y. (2011). TiO(2) and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *Journal of Environmental Monitoring* 13(4): 822-828.

Dubey, S. P., Lahtinen, M., Särkkä, H. &Sillanpää, M. (2010). Bioprospective of Sorbus aucuparia leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80(1): 26-33.

Duran, N., Marcato, P. D., Duran, M., Yadav, A., Gade, A. &Rai, M. (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(5): 1609-1624.

E

Eggenberger, K., Frey, N., Zienicke, B., Siebenbrock, J., Schunck, T., Fischer, R., Bräse, S., Birtalan, E., Nann, T. &Nick, P. (2010). Use of Nanoparticles to Study and Manipulate Plant cells. *Advanced Engineering Materials* 12(9): B406-B412.

Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. &Goldbach, H. E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* 134(1): 151-160.

Eklund, P. C., Holden, J. M. &Jishi, R. A. (1995). Vibrational modes of carbon nanotubes - spectroscopy and theory. *Carbon* 33(7): 959-972.

El-Temsah, Y. S. &Joner, E. J. (2010). Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental toxicology*: n/a-n/a.

F

Fabrega, J., Renshaw, J. C. &Lead, J. R. (2009). Interactions of Silver Nanoparticles with Pseudomonas putida Biofilms. *Environmental Science & Technology* 43(23): 9004-9009.

Falck, G., Lindberg, H., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K. &Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO2. *Human & Experimental Toxicology* 28(6-7): 339-352.

Fang, J., Shan, X. Q., Wen, B., Lin, J. M. &Owens, G. (2009). Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental Pollution* 157(4): 1101-1109.

Fang, X. H., Yu, R., Li, B. Q., Somasundaran, P. &Chandran, K. (2010). Stresses exerted by ZnO, CeO(2) and anatase TiO(2) nanoparticles on the Nitrosomonas europaea. *Journal of Colloid and Interface Science* 348(2): 329-334.

Farges, F., Brown, G. E. &Rehr, J. J. (1997). Ti K-edge XANES studies of Ti coordination and disorder in oxide compounds: Comparison between theory and experiment. *Physical Review B* 56(4): 1809-1819.

Fenoglio, I., Greco, G., Livraghi, S. &Fubini, B. (2009). Non-UV-Induced Radical Reactions at the Surface of TiO2 Nanoparticles That May Trigger Toxic Responses. *Chemistry-a European Journal* 15(18): 4614-4621.

Fent, K., Weisbrod, C. J., Wirth-Heller, A. &Pieles, U. (2010). Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages. *Aquatic Toxicology* 100(2): 218-228.

Ferry, J. L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P. L., Fulton, M. H., Scott, I. G., Decho, A. W., Kashiwada, S., Murphy, C. J. &Shaw, T. J. (2009). Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology* 4(7): 441-444.

Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A. &Laurent, C. (2003). Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications* (12): 1442-1443.

Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E. &Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl2 to a freshwater microalga (Pseudokirchneriella subcapitata): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology* 41(24): 8484-8490.

Fraser, T. W. K., Reinardy, H. C., Shaw, B. J., Henry, T. B. &Handy, R. D. (2011). Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C(60)) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Nanotoxicology* 5(1): 98-108.

French, S., Levy-Booth, D., Samarajeewa, A., Shannon, K. E., Smith, J. &Trevors, J. T. (2009). Elevated temperatures and carbon dioxide concentrations: effect on selected microbial activities in temperate agricultural soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(11): 1887-1900.

Friends of the earth (2006).Nanomaterials, sunscreens and cosmetics : small ingredients, big risks.

Friends of the Earth (2008).OUT OF THE LABORATORY AND ON TO OUR PLATES : Nanotechnology in Food & Agriculture.

G

Gade, A., Gaikwad, S., Tiwari, V., Yadav, A., Ingle, A. &Rai, M. (2010). Biofabrication of Silver Nanoparticles by Opuntia ficus-indica: In vitro Antibacterial Activity and Study of the Mechanism Involved in the Synthesis. *Current Nanoscience* 6(4): 370-375.

Galbraith, D. W. (2007). Nanobiotechnology - Silica breaks through in plants. *Nature Nanotechnology* 2(5): 272-273.

Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B. D., Moger, J. &Regoli, F. (2010). Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158(5): 1748-1755.

Gao, F. Q., Hong, F. H., Liu, C., Zheng, L., Su, M. Y., Wu, X., Yang, F., Wu, C. &Yang, P. (2006). Mechanism of nano-anatase TiO2 on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach - Inducing complex of Rubisco-Rubisco activase. *Biological Trace Element Research* 111(1-3): 239-253.

Gao, F. Q., Liu, C., Qu, C. X., Zheng, L., Yang, F., Su, M. G. &Hong, F. H. (2008). Was improvement of spinach growth by nano-TiO2 treatment related to the changes of Rubisco activase? *Biometals* 21(2): 211-217.

Garaud, J. C. &Roussel, G. (2011). Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. 317 p.

Garcia, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., Gonzalez, E., Puntes, V., Barata, C., Font, X. &Sanchez, A. (2011). Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination* 269(1-3): 136-141.

George, S., Xia, T. A., Rallo, R., Zhao, Y., Ji, Z. X., Lin, S. J., Wang, X., Zhang, H. Y., France, B., Schoenfeld, D., Damoiseaux, R., Liu, R., Lin, S., Bradley, K. A., Cohen, Y. &Nal, A. E. (2011). Use of a High-Throughput Screening Approach Coupled with In Vivo Zebrafish Embryo Screening To Develop Hazard Ranking for Engineered Nanomaterials. *Acs Nano* 5(3): 1805-1817.

Ghodake, G., Seo, Y. D. &Lee, D. S. (2011). Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using Allium cepa. *Journal of Hazardous Materials* 186(1): 952-955.

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. &Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO(2)) nanoparticles at two trophic levels Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81(10): 1253-1262.

Glory, J., Mierczynska, A., Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M. &Reynaud, C. (2007). Dispersion study of long and aligned multi-walled carbon nanotubes in water. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7(10): 3458-3462.

Gong, N., Shao, K. S., Feng, W., Lin, Z. Z., Liang, C. H. &Sun, Y. Q. (2011). Biotoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae Chlorella vulgaris. *Chemosphere* 83(4): 510-516.

Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Coronado, M. J., Corredor, E., Testillano, P. S., Risueno, M. C., Marquina, C., Ibarra, M. R., Rubiales, D. &Perez-De-Luque, A. (2008). Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany* 101(1): 187-195.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W. &Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO(2), ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* 43(24): 9216-9222.

Greenwood, N. N. &Earnshaw, A. (Eds) (1984). *Chemistry of the elements.* New York: Pergamon Press.

Grossemy, F. (2008).Des grains cométaires en laboratoire : premiers résultats de la mission Stardust. 300 Paris: Université Paris-Sud XI.

Gubbins, E. J., Batty, L. C. &Lead, J. R. (2011). Phytotoxicity of silver nanoparticles to Lemna minor L. *Environmental Pollution* 159(6): 1551-1559.

Gurr, J., Wang, A. S. S., Chen, C. &Jan, K. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213: 66-73.

H

Hall, S., Bradley, T., Moore, J. T., Kuykindall, T. &Minella, L. (2009). Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO(2) particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO(2) toxicity. *Nanotoxicology* 3(2): 91-97.

Halliwell, B. &Gutteridge, J. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Clarandon Press.

Hao, L. H., Wang, Z. Y. &Xing, B. S. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO(2) nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (Cyprinus carpio). *Journal of Environmental Sciences-China* 21(10): 1459-1466.

Hartmann, N. B., Von der Kammer, F., Hofmann, T., Baalousha, M., Ottofuelling, S. &Baun, A. (2010). Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology* 269(2-3): 190-197.

Haverkamp, R. G. &Marshall, A. T. (2009). The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research* 11(6): 1453-1463.

Haverkamp, R. G., Marshall, A. T. &van Agterveld, D. (2007). Pick your carats: nanoparticles of gold-silver-copper alloy produced in vivo. *Journal of Nanoparticle Research* 9(4): 697-700.

Heath, R. L. &Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts : I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.

Heckmann, L. H. H. L. H., Hovgaard, M. B., Sutherland, D. S., Autrup, H., Besenbacher, F. &Scott-Fordsmand, J. J. (2011). Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm Eisenia fetida. *Ecotoxicology* 20(1): 226-233.

Herlin-Boime, N., Leconte, Y., Porterat, D., Reynaud, C. &Sublemontier, O. (2008). Laser pyrolysis: a versatile method to produce nanopowder. *Actualité chimique* 317: 14-15.

Hoenig, M. (2001). Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps. *Talanta* 54(6): 1021-1038.

Hong, F. H., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z. G., Gu, F. G., Wu, C., Ma, Z. N., Zhou, J. &Yang, P. (2005a). Influences of nano-TiO2 on the chloroplast aging of spinach under light. *Biological Trace Element Research* 104(3): 249-260.

Hong, F. H., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L. &Yang, P. (2005b). Effect of nano-TiO2 on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research* 105(1-3): 269-279.

Hooper, H. L., Jurkschat, K., Morgan, A. J., Bailey, J., Lawlor, A. J., Spurgeon, D. J. &Svendsen, C. (2011). Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm Eisenia veneta in a soil matrix. *Environment International* 37(6): 1111-1117.

Hu, C. W., Li, M., Cui, Y. B., Li, D. S., Chen, J. &Yang, L. Y. (2010). Toxicological effects of TiO(2) and ZnO nanoparticles in soil on earthworm Eisenia fetida. *Soil Biology & Biochemistry* 42(4): 586-591.

Hund-Rinke, K. &Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles TiO2 on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research* 13(4): 225-232.

I

Isaure, M. P., Fayard, B., Sarret, G., Pairis, S. &Bourguignon, J. (2006). Localization and chrmical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. *Spectrochim Acta, Part B*.

ITCF &ADEME (1998).Blé plante entière. In *Etude Agrice*.

J

Jaisi, D. P. &Elimelech, M. (2009). Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Limited Transport in Soil Columns. *Environmental Science & Technology* 43(24): 9161-9166.

Jia, N. Q., Lian, Q., Tian, Z., Duan, X., Yin, M., Jing, L. H., Chen, S. H., Shen, H. B. &Gao, M. Y. (2010). Decorating multi-walled carbon nanotubes with quantum dots for construction of multi-color fluorescent nanoprobes. *Nanotechnology* 21(4).

Jiang, J., Oberdorster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P. &Biswas, P. (2008). Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology* 2(1): 33-42.

Jiang, X. J., Tong, M. P., Li, H. Y. &Yang, K. (2010). Deposition kinetics of zinc oxide nanoparticles on natural organic matter coated silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 350(2): 427-434.

Jin, C., Tang, Y., Yang, F., Li, X., Xu, S., Fan, X., Huang, Y. &Yang, Y. (2011). Cellular Toxicity of TiO2 Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase. *Biological Trace Element Research* 141(1): 3-15.

Jin, X., Li, M. H., Wang, J. W., Marambio-Jones, C., Peng, F. B., Huang, X. F., Damoiseaux, R. &Hoek, E. M. V. (2010). High-Throughput Screening of Silver Nanoparticle Stability and Bacterial Inactivation in Aquatic Media: Influence of Specific Ions. *Environmental Science & Technology* 44(19): 7321-7328.

Johnston, B. D., Scown, T. M., Moger, J., Cumberland, S. A., Baalousha, M., Linge, K., van Aerle, R., Jarvis, K., Lead, J. R. &Tyler, C. R. (2010). Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO(2), CeO(2), and ZnO to Fish. *Environmental Science & Technology* 44(3): 1144-1151.

Jovanovic, B., Anastasova, L., Rowe, E. W., Zhang, Y. J., Clapp, A. R. &Palic, D. (2011). Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (Pimephales promelas Rafinesque, 1820). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 675-683.

Judy, J. D., Unrine, J. M. &Bertsch, P. M. (2011). Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science & Technology* 45(2): 776-781.

K

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M. &Boller, M. (2008). Synthetic TiO(2) nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* 156(2): 233-239.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z. R., Watanabe, F. &Biris, A. S. (2009). Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. *Acs Nano* 3(10): 3221-3227.

Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., Galanzha, E. I. &Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(3): 1028-1033.

Khodja, H., Berthoumieux, E., Daudin, L. &Gallien, J. P. (2001). The Pierre Sue Laboratory nuclear microprobe as a multi-disciplinary analysis tool. *Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect B* 181: 83-86.

Kim, K. T., Klaine, S. J., Cho, J., Kim, S. H. &Kim, S. D. (2010). Oxidative stress responses of Daphnia magna exposed to TiO(2) nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment* 408(10): 2268-2272.

Klancnik, K., Drobne, D., Valant, J. &Koce, J. D. (2011). Use of a modified Allium test with nanoTiO(2). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(1): 85-92.

Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T. &Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 76(1): 50-56.

Kumari, M., Mukherjee, A. &Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa. *Science of the Total Environment* 407(19): 5243-5246.

Kummerer, K., Menz, J., Schubert, T. &Thielemans, W. (2011). Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere* 82(10): 1387-1392.

Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J. J., Wanzer, M. B., Woloschak, G. E. &Smalle, J. A. (2010). Uptake and Distribution of Ultrasmall Anatase TiO(2) Alizarin Red S Nanoconjugates in Arabidopsis thaliana. *Nano Letters* 10(7): 2296-2302.

L

Laban, G., Nies, L. F., Turco, R. F., Bickham, J. W. &Sepulveda, M. S. (2010). The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (Pimephales promelas) embryos. *Ecotoxicology* 19(1): 185-195.

Lapied, E., Nahmani, J. Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.-M., Oughton, D. H. &Joner, E. J. (2011). Ecotoxicological effects of an aged TiO(2) nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm Lumbricus terrestris after exposure through water, food and soil. *Environment International* 37(6): 1105-1110.

Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A.-M., Brisset, F. &Carrière, M. (submitted). Accumulation, translocation and impact of TiO2 nanoparticles in wheat (Triticum aestivum spp.) *Nanotoxicology*.

Laurette, J. (2011).Rôle de la spéciation de l'uranium sur sa bioaccumulation, son transport et sa toxicité dans les plantes. Application à la phytoremédiation., 290 p Paris: AgroParisTech.

Laurette, J., Larue, C., Mariet, C., Brisset, F., Khodja, H., Bourguignon, J. &Carriere, M. (2012). Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: oilseed rape, sunflower and wheat. . *Environ Experim Botany* in press.

Lazare, S. &Mottay, E. (2007). Spectrométries laser en analyse et caractérisation. *Techniques de l'ingénieur*.

Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y. C., Braam, J. &Alvarez, P. J. J. (2010a). Developmental Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles to Arabidopsis Thaliana. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(3): 669-675.

Lee, J., Ji, K., Kim, J., Park, C., Lim, K. H., Yoon, T. H. &Choi, K. (2010b). Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in Daphnia magna under various light conditions. *Environmental toxicology* 25(6): 593-600.

Lee, S. W., Kim, S. M. &Choi, J. (2009). Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean Daphnia magna and the larva of the aquatic midge Chironomus riparius to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(1): 86-91.

Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H. &Kweon, H. S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (Phaseolus radiatus) and wheat (Triticum aestivum): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1915-1921.

Lei, Z., Su, M. Y., Chao, L., Liang, C., Hao, H., Xiao, W., Liu, X. Q., Fan, Y., Gao, F. Q. &Hong, F. S. (2007a). Effects of nanoanatase TiO2 on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological Trace Element Research* 119(1): 68-76.

Lei, Z., Su, M. Y., Xiao, W., Chao, L., Qu, C. X., Liang, C., Hao, H., Liu, X. Q. &Hong, F. S. (2007b). Effects of nano-anatase on spectral characteristics and distribution of LHCII on the thylakoid membranes of spinach. *Biological Trace Element Research* 120(1-3): 273-283.

Lei, Z., Su, M. Y., Xiao, W., Chao, L., Qu, C. X., Liang, C., Hao, H., Liu, X. Q. &Hong, F. S. (2008). Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research* 121(1): 69-79.

Li, M. H., Czymmek, K. J. &Huang, C. P. (2011). Responses of Ceriodaphnia dubia to TiO(2) and Al(2)O(3) nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. *Journal of Hazardous Materials* 187(1-3): 502-508.

Li, T., Albee, B., Alemayehu, M., Diaz, R., Ingham, L., Kamal, S., Rodriguez, M. &Bishnoi, S. W. (2010). Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on Daphnia magna. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(2): 689-700.

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y. B. &Watari, F. (2009a). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials* 170(2-3): 578-583.

Lin, D. H. &Xing, B. S. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150(2): 243-250.

Lin, D. H. &Xing, B. S. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 42(15): 5580-5585.

Lin, S. J., Bhattacharya, P., Rajapakse, N. C., Brune, D. E. &Ke, P. C. (2009b). Effects of Quantum Dots Adsorption on Algal Photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C* 113(25): 10962-10966.

Lin, S. J., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. A., Rao, A. M., Luo, H. &Ke, P. C. (2009c). Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. *Small* 5(10): 1128-1132.

Liu, Q. L., Chen, B., Wang, Q. L., Shi, X. L., Xiao, Z. Y., Lin, J. X. &Fang, X. H. (2009). Carbon Nanotubes as Molecular Transporters for Walled Plant Cells. *Nano Letters* 9(3): 1007-1010.

Liu, Q. L., Zhao, Y. Y., Wan, Y. L., Zheng, J. P., Zhang, X. J., Wang, C. R., Fang, X. H. &Lin, J. X. (2010). Study of the Inhibitory Effect of Water-Soluble Fullerenes on Plant Growth at the Cellular Level. *Acs Nano* 4(10): 5743-5748.

Lopez-Moreno, M. L., De la Rosa, G., Hernandez-Viezcas, J. A., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R. &Gardea-Torresdey, J. L. (2010a). Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO(2) Nanoparticles on Soybean (Glycine max) Plants. *Environmental Science & Technology* 44(19): 7315-7320.

Lopez-Moreno, M. L., De la Rosa, G., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R. &Gardea-Torresdey, J. L. (2010b). X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Corroboration of the Uptake and Storage of CeO2 Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3689-3693.

Lovern, S. B., Strickler, J. R. &Klaper, R. (2007). Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C-60, and C(60)HxC(70)Hx). *Environmental Science & Technology* 41(12): 4465-4470.

Luca, V., Djajanti, S. &Howe, R. F. (1998). Structural and Electronic Properties of Sol−Gel Titanium Oxides Studied by X-ray Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 102(52): 10650-10657.

Luo, Z. X., Wang, Z. H., Li, Q. Z., Pan, Q. K., Yan, C. Z. &Liu, F. (2011). Spatial distribution, electron microscopy analysis of titanium and its correlation to heavy metals: Occurrence and sources of titanium nanomaterials in surface sediments from Xiamen Bay, China. *Journal of Environmental Monitoring* 13(4): 1046-1052.

M

Ma, H., Kabengi, N. J., Bertsch, P. M., Unrine, J. M., Glenn, T. C. &Williams, P. L. (2011). Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode Caenorhabditis elegans: The importance of illumination mode and primary particle size. *Environmental Pollution* 159(6): 1473-1480.

Ma, L. L., Liu, C., Qu, C. X., Yin, S. T., Liu, J., Gao, F. Q. &Hong, F. S. (2008). Rubisco activase mRNA expression in spinach: Modulation by nanoanatase treatment. *Biological Trace Element Research* 122(2): 168-178.

Ma, X. M., Anand, D., Zhang, X. F., Tsige, M. &Talapatra, S. (2010a). Carbon nanotube-textured sand for controlling bioavailability of contaminated sediments. *Nano Research* 3(6): 412-422.

Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., Zhao, Y. &Chai, Z. (2010b). Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere* 78(3): 273-279.

Manciulea, A., Baker, A. &Lead, J. R. (2009). A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles. *Chemosphere* 76(8): 1023-1027.

Marcon, L., Riquet, F., Vicogne, D., Szunerits, S., Bodart, J. F. &Boukherroub, R. (2010). Cellular and in vivo toxicity of functionalized nanodiamond in Xenopus embryos. *Journal of Materials Chemistry* 20(37): 8064-8069.

Mariet, C., Belhadj, O., Leroy, S., Carrot, F. &Metrich, N. (2008). Relevance of NH4F in acid digestion before ICP-MS analysis. *Talanta* 77(1): 445-450.

Marshall, A. T., Haverkamp, R. G., Davies, C. E., Parsons, J. G., Gardea-Torresdey, J. L. &van Agterveld, D. (2007). Accumulation of gold nanoparticles in Brassic juncea. *International Journal of Phytoremediation* 9(1-3): 197-206.

Mayer, M. (1997). *SIMNRA User's Guide, Report IPP 9/113.* Garching, Germany: Max Planck Institut für Plasmaphysik.

Mayer, M. (1999). SIMNRA, a simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA. *Application of Accelerators in Research and Industry, Pts 1 and 2* 475: 541-544
1168.

McCutcheon, S. C. &Schnoor, J. L. (2003). *Phytoremediation : Transformations and control of contaminants.* John Wiley.

Miao, A. J., Luo, Z. P., Chen, C. S., Chin, W. C., Santschi, P. H. &Quigg, A. (2010). Intracellular Uptake: A Possible Mechanism for Silver Engineered Nanoparticle Toxicity to a Freshwater Alga Ochromonas danica. *Plos One* 5(12).

Miao, A. J., Schwehr, K. A., Xu, C., Zhang, S. J., Luo, Z. P., Quigg, A. &Santschi, P. H. (2009). The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution* 157(11): 3034-3041.

Moeller, L. &Wang, K. (2008). Engineering with precision: Tools for the new generation of transgenic crops. *Bioscience* 58(5): 391-401.

Monthioux, M. &Kuznetsov, V. L. (2006). Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? *Carbon* 44(9): 1621-1623.

Monthioux, M., Smith, B. W., Burteaux, B., Claye, A., Fischer, J. E. &Luzzi, D. E. (2001). Sensitivity of single-wall carbon nanotubes to chemical processing: an electron microscopy investigation. *Carbon* 39(8): 1251-1272.

Moran, R. (1982). Formulas for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiology* 69(6): 1376-1381.

Moretto, P. &Beck, L. (2003). Emission X induite par particules chargées (PIXE) : théorie. *Techniques de l'ingénieur*.

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E. &Gauthier, L. (2007). Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian Ambystoma mexicanum. *Nanotoxicology* 1(2): 149-156.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E. &Gauthier, L. (2008). Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. *Aquatic Toxicology* 87(2): 127-137.

Mueller, N. C. &Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42(12): 4447-4453.

Murashov, V. (2006). Comments on "Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles" by Yang, L., Watts, D.J., Toxicology Letters, 2005, 158, 122-132. *Toxicology Letters* 164(2): 185-187.

Musee, N., Oberholster, P. J., Sikhwivhilu, L. &Botha, A. M. (2010). The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, Physa acuta (Draparnaud, 1805). *Chemosphere* 81(10): 1196-1203.

N

Nabikhan, A., Kandasamy, K., Raj, A. &Alikunhi, N. M. (2010). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, Sesuvium portulacastrum L. *SURF B* 79(2): 488-488.

Nowack, B. &Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1): 5-22.

O

Oberdorster, G., Stone, V. &Ken, D. (2007). Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1(1): 2-25.

Oberholster, P. J., Musee, N., Botha, A. M., Chelule, P. K., Focke, W. W. &Ashton, P. J. (2011). Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate Chironomus tentans larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(3): 416-423.

Oleszczuk, P., Josko, I. &Xing, B. S. (2011). The toxicity to plants of the sewage sludges containing multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials* 186(1): 436-442.

OMS (2008).Nanotechnologies.

Ortega, R. (2005). Imagerie des éléments chimiques. Analyse par faisceau d'ions et rayonnement synchrotron X. *Spectra Analyse* 246: 36-39.

Osswald, S., Havel, M. &Gogotsi, Y. (2007). Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 38(6): 728-736.

P

Panacek, A., Prucek, R., Safarova, D., Dittrich, M., Richtrova, J., Benickova, K., Zboril, R. &Kvitek, L. (2011). Acute and Chronic Toxicity Effects of Silver Nanoparticles (NPs) on Drosophila melanogaster. *Environmental Science & Technology* 45(11): 4974-4979.

Panda, K. K., Acharya, V. M. M., Krishnaveni, R., Padhi, B. K., Sarangi, S. N., Sahu, S. N. &Panda, B. B. (2011). In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro* 25(5): 1097-1105.

Paqueton, H. &Ruste, J. (2006). *La microscopie électronique à balayage*

Park, J. W., Henry, T. B., Menn, F. M., Compton, R. N. &Sayler, G. (2010). No bioavailability of 17 alpha-ethinylestradiol when associated with nC(60) aggregates during dietary exposure in adult male zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere* 81(10): 1227-1232.

Parsons, J. G., Lopez, M. L., Gonzalez, C. M., Peralta-Videa, J. R. &Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Toxicity and Biotransformation of Uncoated and Coated Nickel Hydroxide Nanoparticles on Mesquite Plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(5): 1146-1154.

Paterson, G., Ataria, J. M., Hogue, M. E., Burns, D. C. &Metcalfe, C. D. (2011). The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* 82(7): 1002-1009.

Paucot, H. &Potin-Gautier, M. (2010). ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence - spectrométrie de masse. *Techniques de l'ingénieur*.

Pavel, A. &Creanga, D. E. (2005). Chromosomal aberrations in plants under magnetic fluid influence. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 289: 469-472.

Pavel, A., Trifan, M., Bara, II, Creanga, D. E. &Cotae, C. (1999). Accumulation dynamics and some cytogenetical tests at Chelidonium majus and Papaver somniferum callus under the magnetic liquid effect. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201: 443-445.

Peng, X. H. P. X. H., Palma, S., Fisher, N. S. &Wong, S. S. (2011). Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology* 102(3-4): 186-196.

Petit, A. N., Eullaffroy, P., Debenest, T. &Gagne, F. (2010). Toxicity of PAMAM dendrimers to Chlamydomonas reinhardtii. *Aquatic Toxicology* 100(2): 187-193.

Pignon, B., Maskrot, H., Ferreol, V. G., Leconte, Y., Coste, S., Gervais, M., Pouget, T., Reynaud, C., Tranchant, J. F. &Herlin-Boime, N. (2008). Versatility of laser pyrolysis applied to the synthesis of TiO2 nanoparticles - Application to UV attenuation. *European Journal of Inorganic Chemistry* (6): 883-889.

Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Pichot, V., Launois, P. &Ballutaud, D. (2005). Growth of multiwalled carbon nanotubes during the initial stages of aerosol-assisted CCVD. *Carbon* 43(14): 2968-2976.

Pompa, P. P. P. P. P., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Sabella, S., Maiorano, G., Falqui, A., Bertoni, G. &Cingolani, R. (2011). In Vivo toxicity assessment of gold nanoparticles in Drosophila melanogaster. *Nano Research* 4(4): 405-413.

Powers, C. M., Yen, J., Linney, E. A., Seidler, F. J. &Slotkin, T. A. (2010). Silver exposure in developing zebrafish (Danio rerio): Persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicology and Teratology* 32(3): 391-397.

Poynton, H. C., Lazorchak, J. M., Impellitteri, C. A., Smith, M. E., Rogers, K., Patra, M., Hammer, K. A., Allen, H. J. &Vulpe, C. D. (2011). Differential Gene Expression in Daphnia magna Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO Nanoparticles and Zn Ions. *Environmental Science & Technology* 45(2): 762-768.

Q

Quadros, M. E. &Marr, L. C. (2010). Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles. *Journal of the Air & Waste Management Association* 60(7): 770-781.

R

Racuciu, M. &Creanga, D. (2007a). Cytogenetic changes induced by aqueous ferrofluids in agricultural plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1): 288-290.

Racuciu, M., Creanga, D. &Olteanu, Z. (2009). Water Based Magnetic Fluid Impact on Young Plants Growing. *Romanian Reports in Physics* 61(2): 259-268.

Racuciu, M. &Creanga, D. E. (2007b). Influence of water-based ferrofluid upon chlorophylls in cereals. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1): 291-294.

Racuciu, M. &Creanga, D. E. (2007c). TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissue. *Romanian Journal of Physics* 52(3-4): 395-402.

Racuciu, M. &Creanga, D. E. (2009). Biocompatible Magnetic Fluid Nanoparticles Internalized in Vegetal Tissue. *Romanian Journal of Physics* 54(1-2): 115-124.

Ravel &Newville (2005). *Journal of Synchrotron Radiation* 12: 537-541.

Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R. &Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(8): 3485-3498.

Roh, J. Y., Park, Y. K., Park, K. &Choi, J. (2010). Ecotoxicological investigation of CeO(2) and TiO(2) nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29(2): 167-172.

Roussel-Debet, S., Colle, C., Hurtevent, P. &Morello, M. (2000). Influence d'acides organiques sur la désorption de l'américium 241 et du neptunium 237 à partir d'un sol cultivé acide. *Radioprotection* 35(4): 505-518.

Russier, J., Menard-Moyon, C., Venturelli, E., Gravel, E., Marcolongo, G., Meneghetti, M., Doris, E. &Bianco, A. (2011). Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale* 3(3): 893-896.

S

Sadhasivam, S., Shanmugam, P. &Yun, K. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles by Streptomyces hygroscopicus and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 81(1): 358-362.

Sahandi, S., Sorooshzadeh, A., RezazadehS, H. &Naghdibadi, H. A. (2011). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(2): 171-175.

Scheffer, A., Engelhard, C., Sperling, M. &Buscher, W. (2008). ICP-MS as a new tool for the determination of gold nanoparticles in bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(1): 249-252.

Schmidt, J. &Vogelsberger, W. (2009). Aqueous Long-Term Solubility of Titania Nanoparticles and Titanium(IV) Hydrolysis in a Sodium Chloride System Studied by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Journal of Solution Chemistry* 38(10): 1267-1282.

Schrand, A. M., Schlager, J. J., Dai, L. &Hussain, S. M. (2010). Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nature Protocols* 5(4): 744-757.

Seeger, E., Baun, A., Kastner, M. &Trapp, S. (2009). Insignificant acute toxicity of TiO2 nanoparticles to willow trees. *Journal of Soils and Sediments* 9(1): 46-53.

Serag, M. F., Kaji, N., Gaillard, C., Okamoto, Y., Terasaka, K., Jabasini, M., Tokeshi, M., Mizukami, H., Bianco, A. &Baba, Y. (2011). Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. *ACS Nano* 5(1): 493-499.

Shah, V. &Belozerova, I. (2009). Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water Air and Soil Pollution* 197(1-4): 143-148.

Shi, J. Y., Abid, A. D., Kennedy, I. M., Hristova, K. R. &Silk, W. K. (2011). To duckweeds (Landoltia punctata), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution* 159(5): 1277-1282.

Shirley, Dayanand, A., Sreedhar, B. &Dastager, S. G. (2010). Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Novel Streptomyces Species. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 5(2): 447-451.

Shoults-Wilson, W. A., Zhurbich, O. I., McNear, D. H., Tsyusko, O. V., Bertsch, P. M. &Unrine, J. M. (2011). Evidence for avoidance of Ag nanoparticles by earthworms (Eisenia fetida). *Ecotoxicology* 20(2): 385-396.

Simon-Deckers, A. (2008).Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. 259 Paris: AgroParisTech.

Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C. &Carriere, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253(1-3): 137-146.

Simon-Deckers, A., Loo, S., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Menguy, N., Reynaud, C., Gouget, B. &Carriere, M. (2009). Size-, Composition- and Shape-Dependent Toxicological Impact of Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes toward Bacteria. *Environmental Science & Technology* 43(21): 8423-8429.

Sinani, V. A., Gheith, M. K., Yaroslavov, A. A., Rakhnyanskaya, A. A., Sun, K., Mamedov, A. A., Wicksted, J. P. &Kotov, N. A. (2005). Aqueous dispersions of single-wall and multiwall carbon nanotubes with designed amphiphilic polycations. *Journal of the American Chemical Society* 127(10): 3463-3472.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G. G., Wright, C. J. &Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30(23-24): 3891-3914.

Slaveykova, V. I. &Startchev, K. (2009). Effect of natural organic matter and green microalga on carboxyl-polyethylene glycol coated CdSe/ZnS quantum dots stability and transformations under freshwater conditions. *Environmental Pollution* 157(12): 3445-3450.

Sole, V. A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P. &Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62(1): 63-68.

Speranza, A., Leopold, K., Maier, M., Taddei, A. R. &Scoccianti, V. (2010). Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd(II). *Environmental Pollution* 158(3): 873-882.

Stampoulis, D., Sinha, S. K. &White, J. C. (2009). Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environmental Science & Technology* 43(24): 9473-9479.

Steinberg, C. E. W., Kamara, S., Prokhotskaya, V. Y., ManusadŽlanas, L., Karasyova, T. A., Timofeyev, M. A., Jie, Z., Paul, A., Meinelt, T., Farjalla, V. F., Matsuo, A. Y. O., Kent Burnison, B. &Menzel, R. (2006). Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* 51(7): 1189-1210.

Strigul, N., Vaccari, L., Galdun, C., Wazne, M., Liu, X., Christodoulatos, C. &Jasinkiewicz, K. (2009). Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to Daphnia magna and Vibrio fischeri. *Desalination* 248(1-3): 771-782.

Su, M. Y., Hong, F. H., Liu, C., Wu, X., Liu, X. Q., Chen, L., Gao, F. Q., Yang, F. &Li, Z. R. (2007a). Effects of nano-anatase TiO2 on absorption, distribution of light, and photoreduction activities of chloroplast membrane of spinach. *Biological Trace Element Research* 118(2): 120-130.

Su, M. Y., Liu, C., Qu, C. X., Zheng, L., Chen, L., Huang, H., Liu, X. Q., Wu, X. &Hong, F. S. (2008a). Nano-anatase relieves the inhibition of electron transport caused by linolenic acid in chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research* 122(1): 73-81.

Su, M. Y., Liu, H. T., Liu, C., Qu, C. X., Zheng, L. &Hong, F. S. (2009). Promotion of nano-anatase TiO2 on the spectral responses and photochemical activities of D1/D2/Cyt b559 complex of spinach. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 72(5): 1112-1116.

Su, M. Y., Liu, J., Yin, S. T., Ma, L. L. &Hong, F. S. (2008b). Effects of nanoanatase on the photosynthetic improvement of chloroplast damaged by linolenic acid. *Biological Trace Element Research* 124(2): 173-183.

Su, M. Y., Wu, X., Liu, C., Qu, C. X., Liu, X. Q., Chen, L., Huang, H. &Hong, F. S. (2007b). Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO2. *Biological Trace Element Research* 119(2): 183-192.

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Moon, J. W., Gu, B. H., Mortensen, N. P., Allison, D. P., Joy, D. C., Phelps, T. J. &Doktycz, M. J. (2010). Silver Nanocrystallites: Biofabrication using Shewanella oneidensis, and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Environmental Science & Technology* 44(13): 5210-5215.

T

Tan, X., Lin, C. &Fugetsu, B. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon* 47(15): 3479-3487.

Tan, X. M. &Fugetsu, B. (2007). Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cells: Evidence of a self-defense response. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3(3): 285-288.

Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G. &Sheehan, D. (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in Mytilus edulis. *Aquatic Toxicology* 100(2): 178-186.

Thomsen, C., Reich, S., Jantoljak, H., Loa, I., Syassen, K., Burghard, M., Duesberg, G. S. &Roth, S. (1999). Raman spectroscopy on single- and multi-walled nanotubes under high pressure. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* 69(3): 309-312.

Tian, Y. A., Gao, B. &Ziegler, K. J. (2011). High mobility of SDBS-dispersed single-walled carbon nanotubes in saturated and unsaturated porous media. *Journal of Hazardous Materials* 186(2-3): 1766-1772.

Torney, F., Trewyn, B. G., Lin, V. S. Y. &Wang, K. (2007). Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology* 2(5): 295-300.

Tripathi, S. T. S., Sonkar, S. K. &Sarkar, S. (2011). Growth stimulation of gram (Cicer arietinum) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale* 3(3): 1176-1181.

U

Unrine, J. M., Hunyadi, S. E., Tsyusko, O. V., Rao, W., Shoults-Wilson, W. A. &Bertsch, P. M. (2010). Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (Eisenia fetida). *Environmental Science & Technology* 44(21): 8308-8313.

US-EPA (1996).Ecological effects test guidelines : Seed germination/Root elongation toxicity test (OPPTS 850.4200).

V

van der Ploeg, M. J. C., Baveco, J. M., van der Hout, A., Bakker, R., Rietjens, I. &van den Brink, N. W. (2011). Effects of C(60) nanoparticle exposure on earthworms (Lumbricus rubellus) and implications for population dynamics. *Environmental Pollution* 159(1): 198-203.

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K. A. C., Van der Meeren, P., Smagghe, G. &Janssen, C. R. (2011). Aggregation and ecotoxicity of CeO(2) nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environmental Pollution* 159(4): 970-976.

W

Wang, H. H., Kou, X. M., Pei, Z. G., Xiao, J. Q., Shan, X. Q. &Xing, B. S. (2011a). Physiological effects of magnetite (Fe(3)O(4)) nanoparticles on perennial ryegrass (Lolium perenne L.) and pumpkin (Cucurbita mixta) plants. *Nanotoxicology* 5(1): 30-42.

Wang, H. H., Wick, R. L. &Xing, B. S. (2009). Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al(2)O(3) and TiO(2) to the nematode Caenorhabditis elegans. *Environmental Pollution* 157(4): 1171-1177.

Wang, S. H. W. S. H., Kurepa, J. &Smalle, J. A. (2011b). Ultra-small TiO(2) nanoparticles disrupt microtubular networks in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell and Environment* 34(5): 811-820.

Wang, X. M., Gao, F. Q., Ma, L. L., Liu, J., Sitao, Y. T., Ping, Y. &Hong, F. H. (2008a). Effects of Nano-Anatase on Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase mRNA Expression in Spinach. *Biological Trace Element Research* 126(1-3): 280-289.

Wang, Y., Seebald, J. L., Szeto, D. P. &Irudayaraj, J. (2010). Biocompatibility and Biodistribution of Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobes in Zebrafish Embryos: In vivo and Multiplex Imaging. *Acs Nano* 4(7): 4039-4053.

Wang, Z., Zhang, Y. X., Huang, Z. B. &Huang, L. (2008b). Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant and Soil* 310(1-2): 137-149.

Watts, D. J. &Yang, L. (2006). Comments on "Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles" by Yang, L., Watts, D.J., Toxicology Letters, 2005, 158, 122-132. Response to comments by Vladimir Murashov. *Toxicology Letters* 164(2): 188-188.

Wei, C. X., Zhang, Y. B., Guo, J., Han, B., Yang, X. &Yuan, J. L. (2010a). Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of Scenedesmus obliquus. *Journal of Environmental Sciences-China* 22(1): 155-160.

Wei, L. P., Thakkar, M., Chen, Y. H., Ntim, S. A., Mitra, S. &Zhang, X. Y. (2010b). Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, Dunaliella tertiolecta. *Aquatic Toxicology* 100(2): 194-201.

Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S. &Landsiedel, R. (2009). Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO(2) and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate Daphnia magna. *Chemosphere* 76(10): 1356-1365.

Wild, E. &Jones, K. C. (2009). Novel Method for the Direct Visualization of in Vivo Nanomaterials and Chemical Interactions in Plants. *Environmental Science & Technology* 43(14): 5290-5294.

Wise, J. P., Goodale, B. C., Wise, S. S., Craig, G. A., Pongan, A. F., Walter, R. B., Thompson, W. D., Ng, A. K., Aboueissa, A. M., Mitani, H., Spalding, M. J. &Mason, M. D. (2010). Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology* 97(1): 34-41.

Wojdyr, M. (2010). *J. Appl. Cryst.* 43: 1126.

Wu, Y. A., Zhou, Q. F., Li, H. C., Liu, W., Wang, T. &Jiang, G. B. (2010). Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (Oryzias latipes) using the partial-life test. *Aquatic Toxicology* 100(2): 160-167.

Wu, Z. (2002). Structural determination of titanium-oxide nanoparticles by x-ray absorption spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* 80(16): 2973.

Wu, Z. Y., Zhang, J., Ibrahim, D., Xian, D. C., Li, G., Tao, Y. &Hu, T. D. (2002). Structural determination of titanium-oxide nanopaticles by X-ray absorption spectroscopy. *App. Phys. Lett.* 80(16): 2973-2975.

www.cetiom.fr (2011).Colza : atouts, points-clés.

www.fao.org Food and Agriculture Organization.

www.inchem.org International programme on chemical safety. Vol. 2011.

www.inrs.fr Dossier: nanomatériaux. Vol. 2011.

www.malvern.com Dynamic Light Scattering (DLS).

www.malverninstruments.fr Je veux mesurer le potentiel zeta.

www.nanodistrict.org Nanoeconomics. Vol. 2011.

www.nanotechproject.org The project on emerging nanotechnologies. Vol. 2011.

www.nanowerk.com Ten things you should know about nanotechnology. Vol. 2011.

www.nsf.gov/nano NSF National Nanotechnology Initiative (NNI). Vol. 2011.

X

Xia, T. A., Zhao, Y., Sager, T., George, S., Pokhrel, S., Li, N., Schoenfeld, D., Meng, H. A., Lin, S. J., Wang, X., Wang, M. Y., Ji, Z. X., Zink, J. I., Madler, L., Castranova, V., Lin, S. &Nel, A. E. (2011). Decreased Dissolution of ZnO by Iron Doping Yields Nanoparticles with Reduced Toxicity in the Rodent Lung and Zebrafish Embryos. *Acs Nano* 5(2): 1223-1235.

Xiong, D. W., Fang, T., Yu, L. P., Sima, X. F. &Zhu, W. T. (2011). Effects of nano-scale TiO(2), ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment* 409(8): 1444-1452.

Xu, M., Deng, G. F., Liu, S. S., Chen, S., Cui, D., Yang, L. M. &Wang, Q. Q. (2010). Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on Phaeodactylum tricornutum. *Metallomics* 2(7): 469-473.

Y

Yang, F., Hong, F. S., You, W. J., Liu, C., Gao, F. Q., Wu, C. &Yang, P. (2006). Influences of nano-anatase TiO2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110(2): 179-190.

Yang, F., Liu, C., Gao, F. Q., Su, M. Y., Wu, X., Zheng, L., Hong, F. S. &Yang, P. (2007). The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO2 treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research* 119(1): 77-88.

Yang, K., Lin, D. H. &Xing, B. S. (2009). Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides. *Langmuir* 25(6): 3571-3576.

Yang, L. &Watts, D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters* 158(2): 122-132.

Yang, Y., Zhu, H. G., Colvin, V. L. &Alvarez, P. J. (2011). Cellular and Transcriptional Response of Pseudomonas stutzeri to Quantum Dots under Aerobic and Denitrifying Conditions. *Environmental Science & Technology* 45(11): 4988-4994.

Yeo, M. K. &Kang, M. (2010). The effect of nano-scale Zn-doped TiO(2) and pure TiO(2) particles on Hydra magnipapillata. *Molecular & Cellular Toxicology* 6(1): 9-17.

Yin, L. Y., Cheng, Y. W., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. &Bernhardt, E. S. (2011). More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on Lolium multiflorum. *Environmental Science & Technology* 45(6): 2360-2367.

Yuan, H. G., Hu, S. L., Huang, P., Song, H., Wang, K., Ruan, J., He, R. &Cui, D. X. (2011). Single Walled Carbon Nanotubes Exhibit Dual-Phase Regulation to Exposed Arabidopsis Mesophyll Cells. *Nanoscale Research Letters* 6.

Z

Zeyons, O., Thill, A., Chauvat, F., Menguy, N., Cassier-Chauvat, C., Orear, C., Daraspe, J., Auffan, M., Rose, J. &Spalla, O. (2009). Direct and indirect CeO(2) nanoparticles toxicity for Escherichia coli and Synechocystis. *Nanotoxicology* 3(4): 284-295.

Zhang, H. F. Z. H. F., He, X. A., Zhang, Z. Y., Zhang, P., Li, Y. Y., Ma, Y. H., Kuang, Y. S., Zhao, Y. L. &Chai, Z. F. (2011a). Nano-CeO(2) Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environmental Science & Technology* 45(8): 3725-3730.

Zhang, Z., He, X., Zhang, H., Ma, Y., Zhang, P., Ding, Y. &Zhao, Y. (2011b). Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics* 3(8): 816-822.

Zhao, C. M. &Wang, W. X. (2010). Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in Daphnia magna. *Environmental Science & Technology* 44(19): 7699-7704.

Zheng, L., Hong, F. S., Lu, S. P. &Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO2 on strength of naturally and growth aged seeds of spinach. *Biological Trace Element Research* 104(1): 83-91.

Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q. &Jin, Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* 10(6): 713-717.

Zhu, X. S., Chang, Y. &Chen, Y. S. (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO(2) nanoparticle aggregates in Daphnia magna. *Chemosphere* 78(3): V-215.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Extrait du BVS N°13 de l'ANSES : Les nanoparticules dans l'écosystème sol **231**

ANNEXE 2 : Extrait du BVS N°14 de l'ANSES : Les nanoparticules dans l'écosystème eau **239**

ANNEXE 3 : Extrait du BVS N°15 de l'ANSES : Écotoxicologie des nanoparticules : avancées méthodologiques dans l'évaluation des risques **247**

ANNEXE 4 : Extrait du BVS N°12 de l'ANSES : Impact de nanoparticules sur des végétaux **255**

ANNEXE 5 : Proceeding de la conférence « *NanoSafe 2010 »* publié dans Journal of Physics : Conference Series **263**

ANNEXE 6 : Proceeding de la conférence « *International Conference on Occupational and Environmental Health »* 2011 publié dans Journal of Toxicology and Environmental Health **273**

ANNEXE 1

anses
alimentation, environnement, travail

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 13 • Mars 2011
Notes d'actualité scientifique

Santé / Environnement / Travail



Les nanoparticules dans l'écosystème sol

Période : février 2010 à août 2010

Camille LARUE et Marie CARRIÈRE

CEA/ADEME – IRAMIS/SIS2M/LSDRM – Gif-sur-Yvette

Mots clés : **Bactéries, Écotoxicité, Nanoparticules, Remédiation, Sol, Ver de Terre**

Alors que le NanoTech Project (www.nanotechproject.org) recensait, en 2009, 1015 produits de consommation courante contenant des nanoparticules (NP) contre 54 en 2005 (soit une augmentation de plus de 1 000 % en 4 ans) et que la production de nanoparticules s'élève à plusieurs millions de tonnes (AFSSET, 2010), l'écotoxicité de ces NP reste encore peu connue. Néanmoins, quelques articles relatent d'importantes avancées dans le domaine. Gottschalk *et al.* (2009) ont notamment modélisé la quantité de NP potentiellement présentes dans les eaux et sols d'Europe. Leurs résultats montrent que la teneur en NP dans les eaux de surface pourrait aller de 0,003 ng/L pour les fullerènes à 21 ng/l pour les NP-TiO_2. De façon plus préoccupante, les sols pourraient s'enrichir de 89 µg/kg en NP-TiO_2 chaque année. Or, la modélisation est menée ici pour une usure et un recyclage classique des nanoproduits. Le cas d'une dissémination accidentelle ou encore de l'introduction volontaire de NP dans l'environnement n'est pas pris en compte. Devant ce constat, il est important d'évaluer l'impact que pourraient avoir ces NP sur l'écosystème sol (c'est-à-dire le sol et ses habitants) qui semble être le plus menacé. Ainsi, les articles commentés dans cette note analyseront le devenir de NP dans les sols, leurs impacts sur la biomasse du sol (bactérie et ver de terre) et enfin leur utilisation pour la remédiation[1] des sols.

Élaboration d'une méthode permettant de déterminer la rétention de nanoparticules d'argent (NP-Ag) et d'oxyde de cérium (NP-CeO_2) dans les sols

Cornelis G, Kirby JK, Beak D, Chittleborough D, McLaughlin MJ. A method for determination of retention of silver and cerium oxide manufactured nanoparticles in soils. Environ Chem. 2010 ; 7 : 298-308.

Analyse

Cornelis *et al.* (2010) présentent, dans leur article, une technique permettant de déterminer la rétention des nanoparticules d'argent et d'oxyde de cérium dans les sols. Cette méthode est basée sur le calcul de coefficients de fractionnement liquide/solide de solutés dans le sol (K_d) selon :

$$K_d = M_{solide} \times [M] \text{ -1 (l kg-1)}$$

avec M_{solide}, la concentration de l'élément dans le sol (mg kg^{-1} sol) et [M], la concentration de l'élément en solution (mg l^{-1}).

Ainsi, plus le K_d est élevé, plus l'élément est retenu dans le sol. Pour les NP, un autre coefficient de fractionnement a été élaboré sur le même principe mais prenant en compte les phénomènes de dissolution, propres aux NP (K_r).

L'étude est menée sur des particules nanométriques et micrométriques ajoutées au sol, sur la forme ionique des éléments considérés ainsi que sur les éléments Ag et Ce naturellement présents (forme géogénique[2]) dans le sol, permettant ainsi de comparer la rétention en fonction de la forme physico-chimique de l'élément.

Pour cela, les différentes formes d'Ag et de Ce en solution sont ajoutées dans les sols, à une concentration proche de 2 mg kg^{-1}. Ce mélange est agité pendant 24 h puis les deux phases (solide et liquide) sont séparées par centrifugation. Le fractionnement des espèces se fait par différentes étapes de filtration et la quantité de l'élément est déterminée dans chaque fraction par ICP-MS[3]. La rétention est étudiée sur 5 sols aux caractéristiques physico-chimiques variées. Chacune des étapes menant à l'obtention des coefficients a fait l'objet d'une optimisation.

Les Kr obtenus varient, selon les sols, de 77 à 2165 l kg^{-1} pour les NP-Ag, et de 1 à 8 282 l kg^{-1} pour NP-CeO_2. Les K_r les plus élevés sont obtenus pour les sols les plus argileux. Pour l'Ag, les K_d des formes ionique et géogénique sont différents des K_r mais ils restent néanmoins du même ordre de grandeur. Pour le CeO_2, les K_d des formes ionique et géogénique sont nettement plus élevés que les Kr. Les NP-CeO_2 sont ainsi moins retenues dans le sol que les autres formes de cérium et, par corrélation, elles se retrouvent donc plus en solution. Enfin, dans les deux cas, les formes micrométriques de l'Ag et du Ce sont 1 000 fois plus retenues dans le sol que n'importe quelle autre forme physico-chimique.

En conclusion, les auteurs montrent que la rétention d'un élément dans le sol est fortement dépendante de l'état physico-chimique de l'élément ainsi que de la texture du sol. Dans ce cas, les NP-Ag sont plus retenues dans les sols que les NP-CeO_2.

Commentaire

Cet article traite de la rétention des NP d'argent (largement utilisée pour leurs propriétés antibactériennes) et des NP d'oxyde de cérium (additif répandu dans l'essence diesel) dont la toxicité a déjà été prouvée. Déterminer la rétention des NP donne également accès à leur mobilité dans le sol, c'est-à-dire la possibilité qu'elles soient transportées jusqu'à un autre compartiment de l'environnement (eaux profonde ou de surface), qu'elles contamineraient alors. C'est également une indication de leur biodisponibilité, c'est-à-dire leur disponibilité vis-à-vis des organismes vivants (végétaux et animaux). Du point de vue écotoxicologique, il est donc important d'avoir accès à ces données qui sont des indicateurs de la contamination potentielle des écosystèmes.

De plus, le travail d'optimisation de toutes les étapes du processus de préparation des échantillons est très bien mené et précisément détaillé. Ce travail n'avait jamais été décrit pour des particules nanométriques, alors que cette méthode des coefficients de fractionnement est largement utilisée pour les polluants organiques et inorganiques.
Au final, ces données expérimentales pourraient être intégrées à un modèle qui permettrait de prédire le comportement de différents types de NP selon les propriétés du sol.

Effets cytotoxiques[4] de NP de TiO_2, ZnO et CeO_2 sur une bactérie du sol : *Nitrosomonas europeae*

Fang X, Yu R, Li B, Somasundaran P, Chandran K. Stresses exerted by ZnO, CeO_2 and anatase TiO_2 nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea*. J Colloid Interface Sci. 2010 ; 348 : 329-334.

Analyse

Dans cette étude menée sur une bactérie du sol (*Nitrosomonas europeae*), la toxicité des NP est étudiée, et mise en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques : composition chimique (TiO_2, ZnO ou CeO_2), diamètre (25 et 200 nm pour TiO_2 - anatase) et forme (sphérique pour TiO_2 et ZnO ou bâtonnet pour CeO_2).
Dans un premier temps, les caractéristiques physico-chimiques des NP sont rapportées (taille, surface spécifique[5], point de charge nulle[6] et potentiel zeta[7] dans le milieu de culture à pH 7,5). Après 4 h d'exposition à 0, 20 et 200 mg/l de NP, ces analyses sont renouvelées sur le complexe « bactéries+NP » et la morphologie des bactéries est observée par microscopie électronique à transmission.
Les auteurs constatent qu'en présence de NP-TiO_2 et NP-ZnO, les bactéries exposées voient leur diamètre diminuer quelle que soit la concentration. Cette diminution du diamètre est légèrement plus importante pour les NP-TiO_2 de 200 nm que pour celles de 25 nm. En revanche, l'effet de la forme de la NP est plus net puisque les bâtonnets de CeO_2 n'entraînent une diminution de diamètre que lorsque les bactéries sont exposées à forte concentration. Toutes NP confondues, les auteurs observent une diminution d'environ 30 % du diamètre des bactéries à 200 mg/l. Ces observations sont corrélées aux modifications de potentiel zeta : à 20 mg/l, il augmente légèrement pour les bactéries exposées aux NP-TiO_2 et NP-ZnO mais n'est pas modifié pour celles exposées aux NP-CeO2. À 200 mg/l, le potentiel zeta se stabilise, quelle que soit la NP, autour de – 20,5 mV alors que la bactérie seule a un potentiel de – 22,4 mV. Enfin, concernant la morphologie, ce sont les bactéries exposées aux NP-TiO_2 qui sont les plus endommagées avec de fortes distorsions et l'apparition de cavités au sein de la bactérie. Ces effets semblent plus prononcés avec les NP de 25 nm qu'avec celles de 200 nm. Les observations ne laissent pas apparaître de NP à l'intérieur des cellules et très peu de NP sont adsorbées à la surface. Lors de l'exposition aux NP-ZnO, les bactéries sont distordues de façon moindre, mais les membranes semblent davantage endommagées. Enfin, pour l'exposition aux NP-CeO_2, il n'y a pas de modification majeure dans les parois et membranes. Cependant, des cavités intracellulaires se sont formées et des NP sont adsorbées sur les parois. L'étude a été menée en parallèle avec des ions Zn^{2+}, les résultats obtenus tendent à montrer que les effets notés pour les NP-ZnO proviennent de la dissolution des NP. Des analyses d'ultracentrifugation ont été menées pour corroborer ces résultats : toutes les bactéries exposées aux NP ont des coefficients de sédimentation plus élevés et sont donc « plus lourdes » que les bactéries témoins. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'adsorption d'espèces ioniques chargées positivement à la surface des bactéries et qui viendraient perturber l'équilibre osmotique des cellules.

Commentaire

Jusqu'à ces dernières années les études d'écotoxicologie prenaient peu en compte les caractéristiques physico-chimiques des NP. Néanmoins, les études les plus récentes attachent une importance croissante à ces caractérisations (Stone *et al*, 2010). Ici, ces caractéristiques sont mises en relation avec la toxicité des NP. Ainsi, la forme de la NP semble influencer la toxicité de façon plus importante que sa taille. Cependant, notons que les auteurs ne mettent pas en relation les effets causés par des NP-CeO_2 de forme sphérique avec ceux causés par les NP-CeO_2 de forme allongée. Ainsi, cette étude ne permet pas de conclure de façon sûre à un effet de la forme de la NP, puisque dans le cas des NP-CeO_2, le facteur « forme » et le facteur « composition chimique » diffèrent.
De même, l'impact de la dissolution des NP a souvent été négligé. Les auteurs montrent ici que la dissolution des NP de ZnO en Zn^{2+} pourrait expliquer leur toxicité.
Cet article confirme donc l'importance de caractériser précisément la physico-chimie et la dissolution des NP en parallèle aux études d'écotoxicologie.

Impact des NP de TiO_2 et de ZnO sur un ver de terre : *Eisenia fetida*

Hu CW, Li M, Cui YB, Li DS, Chen J, Yang LY. Toxicological effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biol Biochem. 2010 ; 42 : 586-591.

Analyse

Hu *et al.* (2010) ont étudié l'impact de NP de TiO_2 et ZnO (10 à 20 nm de diamètre) sur le ver de terre *Eisenia fetida*. Différents paramètres sont étudiés : la bioaccumulation, l'efficacité du système de défense antioxydant (superoxyde dismutase[8], SOD et catalase[9], CAT), l'efficacité de la nutrition (cellulase[10]), les atteintes aux membranes plasmiques (malondialdéhyde[11], MDA), aux mitochondries et à l'ADN. Les vers de terre sont exposés pendant 7 jours dans un sol auquel sont ajoutées 0 à 5 g kg^{-1} de NP.
Les résultats montrent que les NP-ZnO sont plus toxiques pour le ver de terre que les NP-TiO_2, ce qui peut être mis en relation avec une bioaccumulation12 plus importante du Zn que du Ti. En effet, les teneurs des vers de terre en zinc et en titane sont multipliées respectivement par 8 et 12 par rapport aux témoins (animaux non exposés). De plus, l'activité de la CAT et le contenu

en MDA augmente dès une exposition à 0,1 g kg^{-1} de NP-ZnO, et seulement pour des concentrations plus élevées de NP-TiO_2 (1 et 5 g kg-1). De même, l'activité de la SOD et de la cellulase diminue davantage après exposition aux NP-ZnO. Aux fortes doses de NP-ZnO, le système de défense du ver de terre est dépassé, comme l'indique la chute de l'activité de la CAT et du contenu en MDA. Enfin, aux fortes doses de NP-ZnO et NP-TiO_2, les auteurs notent une modification de la morphologie des mitochondries ainsi que des dommages à l'ADN.
Ainsi, les NP de TiO_2 et ZnO sont toxiques pour le ver de terre mais seulement aux plus fortes doses. Les NP-ZnO sont plus toxiques que les NP-TiO_2.

Commentaire

Cette étude est pertinente à plusieurs points de vue. En effet, les NP de TiO_2 et ZnO sont largement utilisées dans les crèmes solaires ainsi que dans les produits autonettoyants, il est donc probable qu'elles soient disséminées dans les écosystèmes. De plus, les vers de terre représentent de 60 à 80 % de la biomasse du sol. Enfin, tous les tests de toxicité ont été menés selon les recommandations de l'OCDE. D'autre part, la caractérisation physico-chimique fournie par les producteurs de NP a été confirmée en laboratoire.
Néanmoins, il réside ici une réelle lacune : l'étude de la dissolution des NP. En effet, les auteurs mettent en avant la bioaccumulation du zinc et la toxicité des NP-ZnO, or il est connu que ce type de NP est sujet à une dissolution, avec pour conséquence la libération dans le milieu d'exposition d'ions Zn^{2+} toxiques. Ainsi, tous les résultats observés pourraient être liés à la présence de ces ions.
Enfin, les doses pour lesquelles la toxicité est démontrée sont tellement élevées qu'il est peu probable de les rencontrer dans l'environnement, sauf si les NP y sont introduites de façon intentionnelle, par exemple en vue de la remédiation des sols.

Immobilisation de l'arsenic dans les sols par des nanoparticules de fer : fer à la valence zéro (ZVI), sulfure de fer (FeS) et magnétite (Fe_3O_4)

Zhang MY, Wang Y, Zhao D Y, Pan G. Immobilization of arsenic in soils by stabilized nanoscale zero-valent iron, iron sulfide (FeS) and magnetite (Fe_3O_4) particles. Chinese Sci Bull 2010 ; 55 : 365-72.

Analyse

Zhang *et al.* (**2010**) mettent en évidence le rôle des NP de fer dans la remédiation de sols contaminés à l'arsenic. Il existe plusieurs types de remédiation. Ici, il s'agit d'immobiliser l'arsenic dans les sols pour éviter la lixiviation[13] et diminuer la biodisponibilité. par immobilisation de cette substance dans les sols. Les auteurs testent ainsi l'efficacité de trois types de NP à base de fer (ZVI, FeS et Fe_3O_4), stabilisées par de l'amidon, sur deux sols différents (sol de verger et de champ de tir). De plus, ils font varier le ratio Fe :As de 5:1 à 100 :1 ainsi que le temps de contact (3 à 7 jours). Après incubation des sols dans une suspension de NP, la bioaccessibilité[14] et la lixiviation de l'arsenic des sols sont examinées.

Dans un premier temps, les auteurs s'assurent que l'ajout des NP n'entraine pas de désorption de l'arsenic des sols, ni de modification majeure du pH. Les résultats montrent que l'ajout de NP de fer tend à faire diminuer les deux indicateurs de façon dépendante de la dose mais indépendamment du temps de contact. Il semble également que la forme Fe_3O_4 soit la plus efficace. Ainsi, pour un ratio de 100 :1 (Fe3O4 :As) et un temps de contact de 3 jours, la bioaccessibilité et la lixiviation de l'arsenic dans les sols sont diminuées d'environ 60 %. Ces diminutions sont plus marquées sur le sol de verger qui se trouve contenir moins de fer et plus d'arsenic que le sol de champs de tir.
Ainsi, les NP de Fe_3O_4 seraient un bon moyen de stabiliser les sols pollués.

Commentaire

Cette étude présente des manques. Ainsi, on peut déplorer le fait que les expériences n'aient pas été menées en parallèle avec une forme non nanoparticulaire du fer, étude qui pourrait mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de la forme nanoparticulaire. En effet, le fer est déjà connu pour ses propriétés stabilisantes dans les sols. Les résultats obtenus ici sont malgré tout mis en relation avec ceux de la bibliographie qui montrent que les NP de fer seraient plus efficaces. Si les phénomènes de complexation à la surface des NP sont évoqués par les auteurs pour justifier la stabilisation de l'arsenic, aucune caractérisation des NP n'a été réalisée, il n'y a donc aucune indication de leur surface spécifique. Enfin, la différence de résultats obtenue entre les deux sols est expliquée par leur contenu respectif en fer. Au début de l'étude, les auteurs mentionnent que les textures des sols sont différentes : l'un à dominance sableuse et l'autre à dominance argileuse. Or, il a été prouvé que la texture des sols est un paramètre important pour expliquer les interactions entre sol et NP. La texture des sols pourrait donc aussi bien expliquer les différences décrites.
Néanmoins, cet article est intéressant car il montre que les NP peuvent être employées pour pallier efficacement à la pollution des sols par l'arsenic. On limite la toxicité de l'arsenic en en limitant la mobilisation et donc la lixiviation, qui entraînerait une pollution des eaux de surface et de boisson. De plus, l'arsenic est un polluant largement répandu dans les sols. Il entrait dans la formulation des pesticides et se trouve être aujourd'hui le deuxième polluant dans les sols américains. Cependant l'introduction de NP de façon intentionnelle dans les sols reste problématique, car leur innocuité pour l'environnement et les Hommes n'a toujours pas été démontrée.

Conclusion générale

Au-delà des résultats obtenus, ces articles mettent en évidence les progrès faits en termes de caractérisation physico-chimique des NP. En effet, ces caractérisations sont maintenant présentes de façon beaucoup plus systématique dans les études. La spécificité de la taille nanométrique du matériau est de plus en plus prise en compte avec notamment l'optimisation des protocoles préexistants. Enfin, les tests de toxicité sont réalisés dans des conditions qui s'approchent toujours plus du modèle environnemental (exposition dans des sols à des doses plus faibles). En ce qui concerne la toxicité des NP pour l'écosystème sol, même si l'on ne peut pas tirer de conclusion générale, certains paramètres, notamment la texture du sol, pourraient être des facteurs déterminants de la toxicité. Surtout, alors que les modèles prévoient des teneurs en NP dans les sols inférieures à 1 mg/kg, les effets toxiques n'apparaissent qu'à des concentrations beaucoup plus élevées, de l'ordre de plusieurs mg voire g/kg. Il serait donc intéressant que les prochaines études écotoxicologiques soient réalisées à des concentrations plus faibles, qui seraient plus réalistes des scénarios actuels. Néanmoins, il ne faut pas négliger la « nanoremédiation[15] » qui emploie de fortes doses de NP pour dépolluer les sols. Ces techniques sont en fort développement, notamment outre-Atlantique.

Lexique

(1) Remédiation : la remédiation consiste à diminuer la toxicité d'un site (sol ou eau). Il existe différentes techniques de remédiation dont la bioremédiation (détoxification par des organismes vivants) ou la phytoremédiation (détoxification par des végétaux) qui se sont beaucoup développées ces dernières années.
(2) Géogénique : d'origine naturelle.
(3) ICP-MS : Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry : technique qui permet de mesurer la quantité d'éléments traces dans des échantillons.
(4) Cytotoxique : la cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules.
(5) Surface spécifique : c'est une surface par unité de masse, généralement exprimée en $m^2.g^{-1}$, représentant l'aire disponible pour adsorber une monocouche de molécules.
(6) Point de charge nulle : aussi appelé potentiel isoélectrique, c'est le pH d'une solution aqueuse dans laquelle un solide existe sous un potentiel électrique neutre.
(7) Potentiel zeta : il correspond au potentiel situé entre la couche d'ions adhérents au colloïde et la couche dite « diffuse ».
(8) Superoxide dismutase : c'est une enzyme qui participe au système de défense contre les espèces réactives de l'oxygène dans la cellule.
(9) Catalase : c'est une enzyme qui participe au système de défense contre les espèces réactives de l'oxygène dans la cellule.
(10) Cellulase : c'est une enzyme qui peut décomposer la cellulose (constituant principal de la litière du sol).
(11) Malondialdéhyde : c'est un marqueur du stress oxydant et un indicateur de l'intégrité membranaire.
(12) Bioaccumulation : c'est l'accumulation progressive d'un contaminant ou d'une substance toxique dans un organisme provenant de diverses sources : atmosphère, eau et aliments.
(13) Lixiviation : la lixiviation est une mesure de l'extrabilité, basée sur le test TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure). C'est le rapport entre la quantité de l'élément passé en solution et la quantité totale de l'élément présent au départ dans le sol.
(14) Bioaccessibilité : ce critère est évalué par la méthode PBET (Physiologically Based Extraction Test). Cette extraction est faite dans un milieu qui mime les conditions de l'estomac humain et reflète l'accessibilité *in vivo* de l'élément.
(15) Nanoremédiation : ce terme est employé dans le site de NanoTech Project et désigne les sites remédiés par des nanoparticules.

Publications de référence

Afsset. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Rapport d'expertise collective. Saisine n° 2008/005. 2010.

Gottschalk F, Sonderer T, Scholz W *et al.* Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO_2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environ Sci Technol. 2009 ; 43 : 9216-9222.

Stone V, Nowack B, Baun A *et al.* Nanomaterials for environmental studies : classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. Sci Total Environ. 2010 ; 408 : 1745-1754.

Woodrow Wilson International Center for Scholars. The project on emerging nanotechnologies. http://www.nanotechproject.org.

Revues de la littérature

Ambashta RD, Sillanpää M. Water purification using magnetic assistance : a review. J Hazard Mater. 2010 ; 180 : 38-49.

Brar SK, Verma M, Tyagi RD *et al.* Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - evidence and impacts. Waste Manag. 2010 ; 30 : 504-520.

Marambio-Jones C, Hoek E. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res. 2010 ; 12 : 1531-1551.

Quadros ME, Marr LC. Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. J Air Waste Manag Assoc. 2010 ; 60 : 770-81.

ANNEXE 2

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 14 • Juin 2011
Notes d'actualité scientifique

Santé / Environnement / Travail



Les nanoparticules dans l'écosystème eau

Période : août 2010 à octobre 2010

Camille LARUE et Marie CARRIERE

CEA/Ademe – Iramis/SIS2M/LSDRM – Gif sur Yvette

Mots clés : **Algue, Daphnie, Eau, Ecotoxicité, Nanoparticules, Poisson**

Si les premières études concernant l'écotoxicologie des nanoparticules ne sont apparues que tardivement (première citation sur ISI Web of Knowledge en 2006), ce domaine est en forte expansion depuis. En effet, en 2006 seulement 3 articles étaient publiés alors qu'en 2010 on en recense près d'une cinquantaine. De plus, certains journaux internationalement reconnus consacrent des numéros spéciaux sur l'impact écotoxicologique des nanomatériaux. Ainsi dans la période de veille, les journaux Nanomedecine (impact facteur ≈ 6) et Aquatic Toxicology (impact facteur ≈ 4) ont chacun publié un dossier spécial sur ce thème (Flahaut, 2010 ; Schlenk et Nikinmaa, 2010). Après avoir abordé l'écosystème sol dans le BVS 13, cette note sera focalisée sur l'écosystème eau. Jusqu'ici une grande partie des études d'écotoxicologie a été menée dans l'eau ou dans des milieux de culture liquide, ainsi le comportement des nanoparticules (NP) a souvent été décrit dans ces milieux. Dans cette note, l'accent sera donc mis plus particulièrement sur les organismes vivant dans l'eau. Les articles ont été choisis car ils présentent des études menées sur 3 chainons d'une chaîne trophique simplifiée : une algue, un crustacé (la daphnie) et un poisson. Chacun de ces maillons dépend des précédents et la survie d'un écosystème est liée au maintien de l'équilibre entre ces maillons.

Effets cytotoxiques des nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT) sur une algue marine : *Dunaliella tertiolecta*

Wei L, Thakkar M, Chen Y, Ntim SA, Mitra S, ZhangX. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. Aquat Toxicol. 2010 ; 100 : 194-201.

Analyse

Wei *et al.* (2010) ont étudié l'impact de MWCNT fonctionnalisés (dimensions : 20 à 30 nm de diamètre, 50 µm de long) sur l'algue *Dunaliella tertiolecta*. Les MWCNT sont mis en suspension dans un modèle d'eau de mer reconstituée. Les auteurs testent également l'impact d'un filtrat de cette suspension, préparé par filtration à travers une membrane dont les pores mesurent 0,2 µm.

D'un point de vue physico-chimique, les MWCNT préparés dans l'eau de mer sont agglomérés en paquets de taille micrométrique (environ 2 µm). L'exposition des algues à ces nanotubes conduit à une perturbation de leur croissance, et ce dès la concentration de 1 mg/L. Ainsi, à la plus forte concentration (10 mg/L), la phase de croissance exponentielle de ces algues est retardée de 23 jours et la vitesse de croissance est diminuée de 36 %. Les auteurs calculent ainsi une EC_{50} [1] de 0,82 mg/L après 96 h d'exposition. Cet effet cytotoxique n'existe pas lorsque les algues sont exposées au filtrat de la suspension de MWCNT. D'autre part, ces nanotubes induisent un stress oxydant dans les cellules, évalué par le dosage du glutathion [2], et diminuent leur activité photosynthétique. Lorsque les cellules sont exposées au filtrat de MWCNT, les effets toxiques disparaissent.

Ainsi, les auteurs concluent que les MWCNT sont toxiques pour les algues et que la toxicité provient majoritairement des agrégats de plus de 0,2 µm. De plus, il semblerait qu'un contact direct entre les MWCNT et les algues (adsorption) soit nécessaire pour générer un stress oxydant et perturber la photosynthèse.

Commentaire

Cette étude est menée sur les algues, l'un des premiers maillons de la chaîne alimentaire en milieu aquatique. Dans les études d'écotoxicité des nanoparticules menées actuellement, deux tendances sont encouragées, qui permettent de s'approcher au mieux de conditions environnementales : exposer les modèles à des doses de nanomatériaux faibles et utiliser des milieux d'exposition complexes, proches des milieux rencontrés dans l'environnement. Ici, les doses testées ne dépassent pas 10 mg/L et le milieu d'exposition mime l'eau de mer. Ainsi les auteurs respectent ces prérequis. D'autre part, les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux utilisés et leur état d'agglomération dans le milieu d'exposition sont bien détaillés. Cependant, une des conclusions des auteurs est que les MWCNT non agglomérés, présents dans le filtrat de la suspension de MWCNT, ne sont pas toxiques, or la concentration en MWCNT dans ce filtrat n'a pas été déterminée. Cette concentration pourrait être inférieure à la concentration minimale causant des effets toxiques sur les algues, surtout si les MWCNT en suspension sont principalement agglomérés et donc retenus par la membrane de filtration. Enfin, l'étude physico-chimique des MWCNT a mis en évidence la présence résiduelle du catalyseur de synthèse : le cobalt (1 ‰). Le cobalt pourrait être responsable d'une part de la toxicité observée (Osman *et al.*, 2004).

augmente. Le rythme cardiaque du poisson se trouve accéléré à partir de 400 µg/L de nanoparticules d'argent. Les individus exposés sont sujets à de nombreuses malformations (œdèmes, malformations cardiaques, défaut des yeux, anormalités vertébrales, déformation des viscères...). Ainsi, à une dose de 1000 µg/L d'Ag-NP, 57 % des poissons présentent des malformations dont les plus courantes sont des flexions du squelette et des phénomènes de troncature. Enfin, la structure de l'œil, observée par microscopie électronique à transmission, est profondément modifiée par l'exposition aux nanoparticules d'argent.

Au final, les nanoparticules d'argent sont toxiques pour les poissons, et les effets observés dépendent du stade de développement.

Commentaire

Wu *et al.* (2010) livrent une étude en conditions plus proches de la réalité environnementales (doses faibles et périodes d'exposition longues). Néanmoins, certaines données manquent pour compléter l'analyse, notamment concernant les conditions d'exposition : on ne connait pas la composition du milieu d'exposition ni les conditions de dispersion des nanoparticules dans ce milieu. De plus, la possible dissolution des ions Ag^+ n'est pas prise en compte.

Cependant, cette étude prouve que le fonctionnement du chaînon supérieur de la chaîne alimentaire aquatique (ici représentée par le poisson) est perturbé par une contamination aux nanoparticules : la reproduction, le développement et donc la survie du poisson pourraient être menacés.

Conclusion générale

En conclusion, si on reconsidère les trois niveaux de la chaîne trophique aquatique :

- les algues voient leur croissance fortement ralentie lorsque leur milieu est contaminé par des nanotubes de carbone ;
- les daphnies qui se nourrissent d'algues, peuvent accumuler des nanoparticules qui proviennent à la fois de leur alimentation et de leur milieu. De plus, certaines études montrent que les nanoparticules peuvent être toxiques pour les daphnies (Zhu *et al.*, 2010) ;
- les poissons, qui peuvent se nourrir de daphnies, ont un développement très perturbé en présence de nanoparticules et l'exposition peut entraîner l'éclosion d'individus non-viables.

Ainsi, l'étude de ces trois articles montre que l'équilibre des écosystèmes pourrait être menacé en cas de contamination par des nanoparticules. Ils laissent également à penser que même si un seul maillon était contaminé, il pourrait, *via* la chaîne alimentaire, contaminer toutes les espèces se situant à un rang trophique plus élevé, éventuellement jusqu'à l'Homme.

Notons toutefois que ces études ont été menées en laboratoire et non en conditions réelles, les conclusions apportées ici sont donc à prendre avec précaution, au vue des doses auxquelles les animaux sont exposés (autour du mg/L), et des conditions d'exposition elles-mêmes. Ainsi, si des nanoparticules d'argent sont disséminées dans l'environnement, il est peu probable que leurs concentrations dans l'eau soit aussi élevées (de l'ordre du ng/L selon une étude de Gottschalk *et al.* 2009), et que les nanoparticules ne soient pas altérées par leur séjour dans l'environnement (dissolution, modification de l'état de surface, agglomération et sédimentation).

Lexique

(1) EC_{50} : EC signifie concentration efficace. Cet indicateur, très répandu en toxicologie, représente la concentration nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet maximal d'un produit.

(2) Glutathion : le glutathion sous forme réduite est l'antioxydant majeur des cellules, les protégeant notamment des radicaux libres et donc du stress oxydant.

(3) LC_{50} : LC signifie concentration mortelle (lethal concentration). C'est un autre indicateur de toxicologie répandu qui indique la concentration nécessaire pour entraîner 50 % de la mortalité des individus.

Publications de référence

apps.isiknowledge.com, ISI Web of Knowledge, consulté le 15/11/2010.

Flahaut E. Introduction to the special focus issue: environmental toxicity of nanoparticles. Nanomedicine. 2010 ; 5 : 949-950.

Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW *et al.* Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO_2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environ Sci Tecnol. 2009 ; 43 : 9216-9222.

Osman MEH, El Naggar AH, El-Sheekh MM *et al.* Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. Environ Toxicol Pharmacol. 2004 ; 16 : 169-178.

Schlenk D and Nikinmaa M. Preface. Aquat Toxicol. 2010 ; 100 : 139.

Zhu X, Chang Y, Chen Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO_2 nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. Chemosphere. 2010 ; 78 : 209-215.

Revues de la littérature

Ambashta R and Sillanpää M. Water purification using magnetic assistance: a review. J Hazard Mater. 2010 ; 180 : 38-49.

Brar SK, Verma M, Tyagi RD *et al.* Engineered nanoparticles in

Étude biocinétique de l'internalisation et du relargage de nanoparticules d'argent (Ag-NP) chez *Daphnia magna*

Zhao CM, Wang WX. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia Magna*. Environ Sci Technol. 2010; 44: 7699-7704.

Analyse

Cet article de **Zhao** et **Wang** (2010) relate le transfert de nanoparticules d'argent radiomarquées à travers un crustacé marin, la daphnie (*Daphnia magna)*. Les animaux sont exposés par deux voies distinctes : contamination du milieu de culture ou contamination de la nourriture. Dans ce dernier cas, les daphnies sont nourries avec des algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) elles-mêmes préalablement exposées aux nanoparticules d'argent.

Lorsque les daphnies sont exposées aux nanoparticules en suspension dans le milieu de culture, l'accumulation (mesurée par un compteur de rayonnement gamma) dans les animaux augmente avec la dose et la durée d'exposition. Les auteurs relèvent ainsi jusqu'à 11,6 mg de nanoparticules d'argent/g de daphnie. La cinétique d'accumulation présente 2 phases : pour les faibles concentrations en nanoparticules d'argent (<40 µg/L), la vitesse d'accumulation augmente linéairement, entre 0,08 et 2,30 µg/g/h, tandis que pour les plus fortes concentrations (160 et 500 µg/L), elle augmente de façon non linéaire pour atteindre 1156 µg/g/h. La première phase d'accumulation impliquerait l'adsorption des nanoparticules sur la daphnie ainsi que des flux de nanoparticules au niveau des branchies pendant la respiration. La deuxième phase impliquerait en plus des phénomènes d'ingestion directe de nanoparticules. Quarante-cinq pourcent de ces nanoparticules se trouvent fixées à la carapace, le reste se situe dans les tissus internes des daphnies. Enfin, le prélèvement est plus faible lorsque l'argent est sous forme de nanoparticules que lorsqu'il est sous forme ionique (Ag^+). Après l'étude de l'influx des nanoparticules dans les daphnies, les auteurs se sont intéressés à l'efflux. Après une exposition de 2 jours, les daphnies sont replacées dans un milieu non contaminé. L'efflux de nanoparticules est important les deux premiers jours puis diminue les deux jours suivants. Après cinq à dix jours, la quantité finale restante dans le corps des daphnies est de l'ordre de 5 %. Zhao et Wang (2010) dressent un bilan de l'efflux de NP : il se répartit entre des pertes par les mues (environ 15 %), les fèces (de 20 à 40 %), la transmission à la descendance (3 %) et enfin majoritairement par l'excrétion d'eau (de 50 à 70 %). La dépuration est plus efficace dans le cas d'une exposition aux ions Ag^+ que dans le cas de l'exposition à des nanoparticules d'argent.

En ce qui concerne l'assimilation de nanoparticules *via* la nourriture, les daphnies assimilent entre 22 et 45 % des nanoparticules présentes dans leur nourriture (les algues contiennent entre 0,2 et 9 mg/g d'Ag-NP). De plus, les auteurs constatent que plus les algues sont contaminées plus l'assimilation diminue. Au contraire de la situation contamination par le milieu, l'assimilation des nanoparticules est plus importante que celle des ions. De plus, les auteurs montrent que plus les NP sont petites et plus elles sont retenues dans le corps des daphnies. Dans ce cas, la dépuration est la suivante : après 15 min d'ingestion d'algues radiomarquées, le taux de radiomarquage dans le corps des daphnies diminue pendant 3 h puis se stabilise. Il reste alors entre 20 et 50 % de radioactivité dans la daphnie. La dépuration des nanoparticules est plus aisée lorsque la contamination provient de la nourriture plutôt que du milieu.

Cette étude montre donc que les nanoparticules d'argent sont transférées dans les chaines trophiques.

Commentaire

Cette étude, comme la précédente, se base sur des concentrations en nanoparticules plus probables dans l'environnement, ce qui la rend plus pertinente. C'est l'une des premières études écotoxicologiques à suivre la dynamique des nanoparticules lors de la contamination. Les auteurs ont également fait un effort sur la caractérisation physico-chimique de la nanoparticule initiale mais le complexe formé lors du radiomarquage par l'adsorption d'^{110}Ag n'est pas détaillé. L'adsorption de l'argent radiomarqué sur les NP a certainement modifié leur surface et peut être aussi leur taille.

Enfin, cet article pointe ici deux voies de contamination différentes des écosystèmes, c'est-à-dire soit par une contamination du milieu soit par celle de la nourriture. La conclusion met en évidence le fait que ces deux voies mènent à la contamination du maillon de la chaîne alimentaire considéré.

Étude des effets des nanoparticules d'argent (Ag-NP) sur le développement d'*Oryzias latipes*

Wu Y, Zhou Q, Li H, Liu W, Wang T, Jiang G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. Aquat Toxicol. 2010; 100: 160-167.

Analyse

Wu *et al.* (2010) ont exposé des medakas (poissons vivant à la fois dans des eaux douces et salées) à des nanoparticules d'argent (25 nm) selon deux scénarios : contamination aiguë (jusqu'à 8 mg/L pendant 2 à 7 jours) ou contamination chronique (jusqu'à 1 mg/L pendant 70 jours). Ils ont ensuite étudié les effets des nanoparticules à trois stades du développement du poisson : sur l'embryon, sur la larve et enfin sur le juvénile.

Les nanoparticules d'argent s'avèrent toxiques à partir de 2 mg/L pour les embryons et les adultes et causent 100 % de mortalité en exposition aiguë ($LC_{50}^{(3)}$ = 1,03 mg/L). Dans le scénario de contamination chronique, les auteurs notent une perturbation importante du développement de l'embryon se matérialisant notamment par des retards de développement. En effet, après 7 jours, les embryons témoins sont majoritairement au stade 37 de leur développement alors que les embryons exposés aux nanoparticules d'argent ne sont qu'au stade 34. Parallèlement, le taux d'éclosion est diminué de 38 %. Les auteurs notent également que la pigmentation (nombre de leucophores) et le développement cérébral (mesuré par la taille du lobe optique) des embryons diminuent lorsque la dose de nanoparticules

wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. Waste Manage. 2010 ; 30 : 504-520.
Baun A, Hartmann NB, Grieger KD *et al.* Setting the limits for engineered nanoparticles in European surface waters – are current approaches appropriate? J Environ Manage. 2009 ; 11 : 1774-1781.
Petosa AR, Jaisi DP, Quevedo IR *et al.* Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. Environ Sci Technol. 2010 ; 44 : 6532–6549.

Autres publications identifiées

Choi JE, Kim S, Ahn JH *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquat Toxicol. 2010 ; 100 : 151-159.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules envers un poisson, un autre article a été choisi pour aborder ce sujet.
Petit AN, Eullaffroy P, Debenest T *et al.* Toxicity of PANAM dendrimers to *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat Toxicol. 2010 ; 100 : 187-193.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules envers une algue, un autre article a été choisi pour aborder ce sujet.
Bhattacharya P, Lin S, Turner JP *et al.* Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. J Phys Chem C. 2010 ; 114 : 16556-16561.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules envers une algue, un autre article a été choisi pour aborder ce sujet.
Ivask A, Bondarenko O, Jepihhina N *et al.* Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO_2, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals. Anal Bioanal Chem. 2010 ; 398 : 701-716.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules sur une bactérie intestinale, qui n'appartient pas à l'écosystème eau abordé ici.
Tedesco S, Doyle H, Blasco J *et al.* Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol. 2010 ; 100 : 178-186.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules envers une moule. Bien qu'intéressant cet article n'a pas été choisi car il ne s'intégrait pas dans la chaîne alimentaire simplifiée mimée ici.
Lapied E, Moudilou E, Exbrayat JM *et al.* Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). Nanomedicine. 2010 ; 5 : 975-984.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules sur un ver de terre, qui n'appartient pas à l'écosystème eau abordé ici.
Lopez-Moreno ML, De la Rosa G, Hernandez-Viezcas JA *et al.* Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO_2 nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. Environ Sci Technol. 2010 ; 44 : 7315-7320.
Cet article traite de l'écotoxicité des nanoparticules sur une plante, qui n'appartient pas à l'écosystème eau abordé ici.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Algae, Bacteria, Daphnia magna, Earthworm, Ecotoxicology, Fish, Plant, Soil, Surface water, Toxicology

ANNEXE 3

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 15 • Juillet 2011
Notes d'actualité scientifique

Santé / Environnement / Travail



Écotoxicologie des nanoparticules : avancées méthodologiques dans l'évaluation des risques

Période : novembre 2010 à février 2011

Camille LARUE* et Marie CARRIÈRE**

* CEA/ADEME – IRAMIS/SIS2M/LSDRM – Gif-sur-Yvette
** CEA – IRAMIS/SIS2M/LSDRM – Gif-sur-Yvette

Mots clés : **Chaine trophique, Écotoxicologie, Environnement, Faibles doses, Nanoparticules**

Les connaissances dans le domaine de l'écotoxicité des nanomatériaux progressent. Le comportement des nanomatériaux dans les différents compartiments de l'environnement, leur internalisation dans les organismes et leur toxicité sont de mieux en mieux appréhendés. Ainsi, une revue récente (Bhatt et Tripathi, 2011) propose une liste de mécanismes susceptibles d'être responsables de la toxicité des nanomatériaux (endommagement des membranes, déstabilisation et oxydation des protéines, endommagement des acides nucléiques ou encore production d'espèces réactives de l'oxygène) ainsi que de leur internalisation (traversée passive des membranes, endocytose ou création de pores dans les parois).

En parallèle, l'usage des nanomatériaux s'intensifie aussi, notamment pour la remédiation de sites pollués. Ainsi, sept pays remédient certains de leurs sites contaminés (majoritairement pollués par des composés chlorés) à l'aide de nanoparticules (Karn *et al.*, 2009). Par exemple, un site de BP Global contaminé au trichloroéthane en Alaska a été traité avec des nanoparticules bimétalliques. La pollution a ainsi été diminuée de 60 à 90 %. Les nanomatériaux permettraient de diminuer les coûts de remédiation des sites pollués mais également de diminuer le temps nécessaire à la dépollution. Dans ce contexte, il est donc très important de poursuivre les efforts de recherche en écotoxicologie pour garantir l'innocuité de ce type de technologie.

Les deux précédentes notes d'actualité de cette thématique étaient centrées sur l'impact des nanoparticules sur les écosystèmes sol et eau. L'écosystème air aurait également pu être abordé mais très peu d'études y ont été réalisées spécifiquement sur l'impact des nanoparticules manufacturées. Néanmoins, ce manque peut être partiellement comblé par les études de pollution atmosphérique sur les particules ultrafines également appelées PM 0,1 (avec un diamètre inférieur à 0,1 µm) et quelques études ont été publiées. Notamment une revue a été rédigée par l'équipe de Quadros (Quadros et Marr, 2010) concernant les nanoparticules d'argent retrouvées dans l'air et les eaux de pluies des villes. Ils ont ainsi constaté que 14 % des produits à base de nanoparticules d'argent libéraient les nanoparticules qu'ils contenaient dans l'environnement.

La présente note sera plutôt focalisée sur les avancées méthodologiques réalisées dans les études d'écotoxicologie des nanoparticules. Ces avancées sont notables depuis quelques années mais particulièrement remarquables durant cette période de veille. En particulier, les conditions d'exposition des modèles biologiques sont plus proches de la réalité environnementale : faibles doses, milieux environnementaux, différentes voies de contamination. Enfin, la dernière publication commentée portera sur l'exposition d'une chaîne trophique.

Étude de l'impact de nanomatériaux sur un organisme vivant dans les sédiments : la larve de chironome

Oberholster PJ, Musee N, Botha AM, Chelule PK, Focke WW, Ashton PJ. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. Ecotox Environ Safe. 2011 ; 4: 416-423.

Analyse

Oberholster et ses collaborateurs (2011) ont exposé des larves de chironome à de faibles doses (5 à 5 000 µg/kg) de 7 nanoparticules différentes (2 types d'alumine, 3 types de silice, du pentoxyde d'antimoine (Sb_2O_5) et de l'oxyde ferrique (Fe_2O_3)). Ces nanoparticules sont présentes en grande quantité dans les produits commerciaux et comme co-produits de process industriels (dans les bétons, le caoutchouc, les cosmétiques...). Les différentes nanoparticules sont bien caractérisées à l'aide de nombreuses techniques. Néanmoins, la caractérisation des nanoparticules en milieu solide étant encore impossible, les mesures ont dû être réalisées en milieu liquide. Après 48 h d'exposition, les auteurs notent que les larves ne s'enfouissent plus dans les sédiments lorsqu'elles sont exposées à la plus forte concentration (5 000 µg/kg) des 2 nanoparticules d'alumine et des nanoparticules de Sb_2O_5. Ce changement de comportement les rend plus vulnérables face à de potentiels prédateurs. À la fin des 10 jours d'exposition, la survie et la longueur des animaux diminuent de façon dépendante de la dose pour toutes les nanoparticules. Ainsi, l'exposition à 5 000 µg/kg de γ-alumine, entraine la mortalité de 80 % des individus. Leur diminution de taille est de 13 % par rapport à la taille d'individus non exposés.

Les variations d'activités de 2 enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant, la catalase et la peroxydase totale, sont également évaluées. L'activité de la catalase est nettement augmentée surtout aux plus fortes doses. À l'inverse, l'activité de la peroxydase chute. Enfin, le dernier critère pris en compte est la génotoxicité[1] des nanoparticules. Des cassures de l'ADN sont visibles dès 50 µg/kg pour la γ-alumine, 500 µg/kg pour l'α-alumine et 5 000 µg/kg pour un type de silice, Fe_2O_3 et Sb_2O_5. Ainsi, les 2 types d'alumine sont les plus nocives des nanoparticules testées. Les auteurs essaient ensuite de relier cette toxicité aux caractéristiques physico-chimiques (diamètre, surface spécifique) des nanoparticules. Leur conclusion est que la toxicité des nanoparticules ne peut être attribuée à un paramètre unique mais plutôt à un ensemble de caractéristiques (nanoparticules et milieu d'exposition).

Commentaire

Cet article met en avant plusieurs tendances observables dans les articles parus pendant cette période de veille. D'abord, les doses utilisées sont de plus en plus faibles : ici les auteurs ne dépassent pas les 5 mg/kg et descendent jusqu'à 5 µg/kg. Ces doses sont les plus réalistes des pollutions envisageables. Une autre nouveauté est l'utilisation de substrat (utilisation de sédiments reconstitués) plutôt que de milieux liquides ce qui rend les expériences plus proches des conditions environnementales.
La caractérisation physico-chimique des nanoparticules pourrait être plus complète. Néanmoins, les techniques actuelles ne permettent pas de caractériser précisément les nanoparticules dans ce type de milieu d'exposition, de nouvelles méthodes doivent être développées. Alors que la nanoparticule induisant le plus d'effets toxiques est classée comme légèrement soluble, aucune mesure de sa solubilité dans le milieu n'a été effectuée. De plus, la mesure des diamètres des nanoparticules utilisées dans cette étude est une mesure de diamètres hydrodynamiques[2], qui ne suffit pas à décrire les nanoparticules. En effet les mesures rapportées pourraient représenter le diamètre d'agglomérats de nanoparticules. Il serait plus correct d'y ajouter le diamètre nominal des nanoparticules, mesuré par exemple par microscopie électronique, pour tirer des conclusions relatives à l'influence de l'état d'agglomération sur les effets toxiques des nanoparticules. Au final, il semblerait que les nanoparticules d'alumine puissent induire des effets toxiques lors d'une contamination chronique ou accidentelle des écosystèmes. Pour les autres nanoparticules testées par les auteurs, les doses induisant des effets toxiques (5 000 µg/kg) ne seront probablement pas atteintes dans l'environnement puisque les concentrations prédites par une équipe de chercheurs suisses ne dépassent pas 100 µg/kg (Gottschalk *et al.*, 2009). Enfin cet article souligne le fait que l'impact des nanoparticules dépend étroitement de leur composition, et par conséquent que le risque associé à l'exposition à chaque nanoparticule doit être évalué au cas par cas.

Aucune preuve de prise racinaire et de migration vers les parties aériennes de nanoparticules de dioxyde de cérium dans des plants de maïs

Birbaum K, Brogioli R, Schellenberg M, Martinoia E, Stark WJ, Gunther D, Limbach L. No evidence for cerium dioxide nanoparticle translocation in maize plants. Environ Sci Technol. 2010 ; 44 : 8718-8723.

Analyse

Cette étude s'intéresse à la pénétration et au transfert vers les feuilles de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2, 37 nm, surface : 110 m^2g^{-1}) dans des plants de maïs cultivés sur sol. Ces nanoparticules sont largement employées comme additifs dans les essences diesel donc susceptibles d'être libérées dans l'environnement. L'application des nanoparticules se fait selon deux voies : par voie aérienne (sur les feuilles) et par voie racinaire. Dans la première expérience, un aérosol de nanoparticules (180 mg/m^3) est généré dans l'enceinte de culture des jeunes plants. L'application se fait soit de jour (stomates[3] ouverts), soit de nuit (stomates fermés). Suite à la contamination, trois lots de plantes sont formés pour analyser la quantité de cérium dans les feuilles par ICP-MS[4]. Le premier groupe est constitué des plantes récoltées immédiatement après l'exposition, le deuxième lot subit en plus une étape de rinçage des feuilles à l'eau. Enfin le troisième lot est transféré dans une serre pour y poursuivre sa croissance pendant 3 mois. Un autre type de contamination par voie aérienne mis en œuvre : une feuille de chaque plante est trempée dans une suspension de nanoparticules (10 mg/L) pendant des durées croissantes.
Le dépôt total de cérium sur les feuilles du premier groupe varie entre 150 et 300 µg cérium/g matière sèche (MS) selon que l'exposition ait eu lieu à la lumière ou à l'obscurité. Les auteurs expliquent cette variation par des interactions électrostatiques entre nanoparticules induites par la lumière. Néanmoins, la quantité de nanoparticules ab/adsorbée sur les feuilles (deuxième groupe) ne suit pas cette variation. Après rinçage, il reste 50 µg cérium/g MS sur les feuilles. L'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) montre des nanoparticules adsorbées sur la surface des feuilles avec de gros agglomérats proches des stomates. Après 3 mois de croissance, les auteurs retrouvent à peu près la même quantité de cérium dans les feuilles ayant subi la contamination (30 à 40 µg cérium/g MS). À l'inverse, dans les feuilles apparues après l'exposition, aucune trace de cérium n'est détectée. Cette observation tend à montrer que les nanoparticules ab/adsorbées sur les feuilles plus vieilles n'ont pas été transférées vers les feuilles néoformées[5]. Enfin, une exposition des feuilles en milieu liquide avec des temps d'application allant de 1 minute à 12 h montre que la quantité de cérium dans les feuilles augmente au fil du temps. Les auteurs en déduisent que l'adsorption à la surface des feuilles n'est pas le seul processus impliqué dans cette augmentation mais qu'une partie des nanoparticules est également incorporée dans les feuilles.
La deuxième expérience consiste à un arrosage régulier du sol des plants de maïs avec 100 mL/j d'une suspension de nanoparticules (10 mg/L) pendant 14 jours. À la fin de l'expérience, aucune trace

de cérium n'est détectée dans les différents organes de la plante, il n'y a donc pas de pénétration des nanoparticules dans les plantes après l'exposition racinaire dans du sol.

Commentaire

Ce deuxième article illustre également la tendance à se rapprocher des conditions environnementales. Ainsi, les plantes sont ici cultivées sur un sol reconstitué (sol Einheitserde type ED 73) et non plus en hydroponie[6] comme dans la plupart des études publiées jusqu'à présent. Toutes les voies de contamination ont également été envisagées : contamination racinaire (le plus courant jusqu'ici) mais aussi la contamination par voie aérienne par génération d'un aérosol qui fait toute l'originalité de l'étude. En effet, l'obtention d'un aérosol homogène est difficile et l'utilisation de tels produits peut présenter des risques (par exemple le risque d'inhalation par l'expérimentateur). Ainsi, il semblerait qu'il y ait peu de risques de migration de nanoparticules de dioxyde de cérium (37 nm) dans le maïs suite à une contamination de l'air ou de l'eau d'irrigation des champs. Il est intéressant de confronter ces résultats avec ceux obtenus avec des nanoparticules de CeO_2 en hydroponie (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a ; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b) où les auteurs constatent une pénétration des nanoparticules ainsi qu'un transfert aux parties aériennes. Néanmoins, les nanoparticules étaient plus petites (7 nm) et les concentrations plus élevées (jusqu'à 4 000 mg/L). Il est donc important de poursuivre les investigations et de croiser les résultats.

Les nanoparticules d'or sont bioamplifiées[7] le long d'une chaîne trophique terrestre

Judy J, Unrine J, Bertsch P. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. Environ Sci Technol. 2011 ; 45 : 776-781.

Analyse

Les auteurs étudient le transfert de nanoparticules d'or (Au) de différentes tailles (5, 10 et 15 nm) le long d'une chaîne trophique : du milieu d'exposition à un plant de tabac, et de la plante au consommateur final de la chaîne trophique, en l'occurrence le sphinx du tabac (papillon). Les nanoparticules d'or sont utilisées en médecine mais aussi comme catalyseur ou encore comme agent de contraste. Ainsi, les plants de tabac sont exposés par voie racinaire pendant une semaine dans une suspension de nanoparticules d'or à 100 mg/L. Les plantes sont ensuite rincées et transférées dans l'enceinte de culture des chenilles. Les chenilles se nourrissent pendant une semaine de ces plantes. À la fin de l'expérience, plantes et chenilles sont analysées pour localiser (µ Fluorescence X (µXRF[8]) et quantifier (LA-ICP-MS) l'or dans les organismes.

Dans le tabac, l'or n'est pas détecté dans les feuilles par µXRF mais l'ICP-MS, qui est plus sensible, permet de détecter de 40 à 96 mg Au par kg MS dans les feuilles. La quantité d'or détectée varie selon le diamètre des nanoparticules, la plus forte accumulation étant observée dans le cas des nanoparticules de 10 nm de diamètre. L'or est réparti de façon homogène dans les feuilles.

Dans la larve de sphinx, l'analyse par µXRF révèle une accumulation d'or autour de la lumière de l'intestin. Une analyse en Spectroscopie des rayons X (XAS[9]) permet d'affirmer que l'or présent dans les tissus est sous forme de nanoparticules et non pas sous forme ionique. L'analyse par ICP-MS montre que les larves ayant consommé du tabac exposé à des nanoparticules de 10 et 15 nm de diamètre sont celles qui contiennent le plus d'or, lorsque l'unité considérée est la masse. Si ce résultat est exprimé en nombre de nanoparticules, alors la quantité de nanoparticules dans les larves est équivalente quel que soit le diamètre de la nanoparticule. Enfin, la quantité d'or dans le sphinx est de 6,2 à 11,6 fois plus élevée que la quantité dans les feuilles de tabac, mettant en évidence la bioamplification des NP dans cette chaîne trophique terrestre.

Commentaire

Cette troisième étude illustre une dernière tendance : l'intégration de l'impact des nanoparticules sur une chaîne trophique (le milieu, le producteur primaire et le consommateur). Malheureusement, dans cette expérience le milieu contaminé est un gel et non pas un sol comme en milieu naturel. Cet article met en évidence le phénomène de bioamplification dans les chaînes alimentaires, ce qui signifie que la contamination augmente d'un maillon au maillon supérieur de la chaîne trophique. Néanmoins, l'étude de Birbaum *et al.* (2010) analysée dans le paragraphe précédent montre que le transfert de nanoparticules d'un sol à un végétal est très faible. Alors le risque de transfert dans les chaînes trophiques le sera également. Enfin, cet article est également remarquable pour les techniques de pointe qui y sont employées (µXRF, XAS, LA-ICP-MS).

Conclusion générale

Alors que l'écotoxicologie des nanoparticules est un domaine qui s'est développé récemment (moins d'une dizaine d'années), on assiste aujourd'hui à l'émergence de nouvelles tendances dans la façon de mener les études. Après les premières années de découverte et de mise au point, les études écotoxicologiques se dirigent vers des scénarios de contamination beaucoup plus probables et donc beaucoup plus intéressants et efficaces pour la compréhension des phénomènes en cas de contamination. Cette avancée est donc bénéfique en matière d'évaluation des risques. Les recommandations faites par l'Afsset (Afsset, 2010) pour des milieux d'expositions plus représentatifs et des doses plus faibles sont ainsi suivies. Il faut donc que ce type d'étude se généralise. Il reste encore des critères à étudier. Ainsi, l'utilisation de nanoparticules sous leur forme industrielle (avec agents enrobants...) telles qu'on pourrait les retrouver dans l'environnement suite à leur libération depuis le nanomatériau d'origine serait également plus pertinente (Lapied *et al.*, 2011).

Ou encore certaines études pourraient s'attacher aux effets des très faibles doses de nanoparticules lors d'exposition de longue durée. Les auteurs s'attachent également à relier les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules employées avec leurs effets. Ainsi, certains critères déterminant les effets toxiques des nanoparticules (comme le diamètre nominal par exemple) pourraient bientôt être mis en évidence. L'ensemble des articles commentés dans cette note, et plus généralement l'ensemble des articles de nano-écotoxicologie, montrent que les effets toxiques des nanoparticules doivent être analysés au cas par cas, chaque nanoparticule étant susceptible d'engendrer des dommages qui lui sont spécifiques.

Lexique

(1) Génotoxicité : propriété de certains toxiques de produire des mutations affectant le patrimoine génétique des organismes exposés.

(2) Diamètre hydrodynamique : il définit le diamètre des nanoparticules, couvertes de leur première sphère d'hydratation, lorsqu'elles sont en suspension. Il traduit ainsi les phénomènes d'agglomération et de dispersion dans les milieux aqueux. À l'inverse, le diamètre nominal est le diamètre physique d'une nanoparticule isolée.

(3) Stomate : orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens des végétaux. Il permet les échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant.

(4) (LA-)ICP-MS : pour Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Lors de l'analyse par ablation laser en spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif, l'échantillon est analysé directement après ablation avec un faisceau laser pulsé. Les aérosols ainsi créés sont transportés vers la torche à plasma qui génère la température d'environ 8 000 °C. Ce plasma transforme l'échantillon en des ions qui sont ensuite introduits dans le spectromètre de masse. Ces ions sont séparés et recueillis en fonction de leur masse. Les constituants d'un échantillon inconnu peuvent alors être identifiés et mesurés. Cette technique donne ainsi des informations de concentrations géolocalisées.

(5) Néoformation : formation d'un tissu nouveau, ici formation après la période d'exposition.

(6) Hydroponie : culture hors sol en milieu liquide.

(7) Bioamplifié : la bioamplification (ou biomagnification) décrit le processus par lequel les taux de certaines substances croissent à chaque stade du réseau trophique (chaîne alimentaire).

(8) µXRF : la spectrométrie de fluorescence X (µXRF) est une méthode d'analyse chimique utilisant une propriété physique de la matière, la fluorescence de rayons X. Lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, la matière réémet de l'énergie sous la forme, entre autres, de rayons X ; c'est la fluorescence X. Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon, en analysant ce spectre, on peut en déduire la composition élémentaire.

(9) XAS : la spectroscopie d'absorption de rayons X donne accès à l'organisation atomique et aux liaisons chimiques autour d'un atome absorbant, et ce, quel que soit le milieu dans lequel il se trouve (solide ou liquide). Il y a essentiellement deux types de spectroscopies d'absorption : la spectroscopie sur une gamme étendue d'énergie (EXAFS - "Extended X-ray Absorption Fine Structure") et la spectroscopie au seuil (XANES - "X-ray Absorption Near Edge Structure"). Ces deux techniques permettent de distinguer des éléments dans leur environnement, ce qui rend possible la caractérisation *in situ* des éléments.

Publications de référence

Afsset, avis de mars 2010. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. http://www.afsset.fr/index.php?pageid=689&parentid=690/

Bhatt I, Tripathi BN. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. Chemosphere. 2011 ; 82: 308-317.

Gottschalk F, Sonderer T, Scholtz R *et al.* Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO_2, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environ Sci Technol. 2009 ; 43: 9216-9222.

Karn B, Kuiken T, Otto M. Nanotechnology and *in situ* remediation: a review of the benefits and potential risks. Environ Health Persp. 2009 ; 117: 1823-1831.

Lapied E, Nahmani J, Moudilou E *et al.* Ecotoxicological effects of an aged TiO_2 nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. Environ Int. 2011 ; 37: 1105-1110

Lopez-Moreno M, De la Rosa G, Hernandez-Viezcas JA *et al.* X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) corroboration of the Uptake and Storage of CeO_2 Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. J Agric Food Chem. 2010a ; 58: 3689-3693.

Lopez-Moreno M, De la Rosa G, Hernandez-Viezcas JA *et al.* Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO_2 Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. Environ Sci Technol. 2010b ; 44: 7315-7320.

Quadros ME et Marr LC. Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles. J Air Waste Manage. 2010 ; 60: 770-781.

Revues de la littérature

Bhatt I et Tripathi BN. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. Chemosphere. 2011 ; 82: 308-317.

Kumar P, Robins A, Vardoulakis S *et al.* A review of the characteristics of nanoparticles in the urban atmosphere and the prospects for developing regulatory controls. Atmos Environ. 2010 ; 44: 5035-5052.

Menard A, Drobne D, Jemec A. Ecotoxicity of nanosized TiO_2. Review of *in vivo* data. Environ Pollut. 2011 ; 159: 677-684.

Autres publications identifiées

Canesi L, Fabbri R, Gallo G *et al.* Biomarkers in Mytilus galloprovincialis exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO_2, Nano-SiO_2). Aquat Toxicol. 2010 ; 100: 168-177.

Cet article s'intéresse aux effets de faibles doses de nanoparticules (de 0,05 à 5 mg/L) sur des moules élevées dans une eau de mer reconstituée.

Dasari TP et Hwang HM. The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. Sci Total Environ. 2010 ; 408: 5817-5823.

Les auteurs étudient ici l'impact d'acides humiques qui représentent un premier pas dans la complexification des milieux.

Khodakovskaya MV, De Silva K, Nedosekin DA *et al.* Complex genetic, photothermal and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. PNAS. 2011 ; 108: 1028-1033.

Cette étude met en place un nouveau panel de techniques originales couplant la détection des nanotubes de carbone à leurs effets génotoxiques chez la tomate.

Lee J, Ji K, Kim J *et al.* Acute Toxicity of Two CdSe/ZnSe Quantum Dots with Different Surface Coating in *Daphnia magna* Under Various Light Conditions. Environ Toxicol. 2010 ; 25: 593-600.

Cet article aborde le problème de l'utilisation d'agents dispersants dans la préparation de suspensions de nanoparticules, modifiant ainsi leur toxicité.

Musee N, Oberholster PJ, Sikhwivhilu L *et al.* The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). Chemosphere. 2010 ; 81: 1196-1203.

Cette étude a été menée par la même équipe sud-africaine que l'étude détaillée dans cette note sur les chironomes. C'est donc l'occasion de comparer la toxicité des nanoparticules selon l'organisme considéré.

Poynton HC, Lazorchak JM, Impellitteri CA *et al.* Differential Gene Expression in Daphnia magna Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO Nanoparticles and Zn Ions. Environ Sci Technol. 2011 ; 45: 762-768.

Cette publication permet d'aborder plus précisément les aspects génétiques de l'écotoxicité des nanoparticules sur un organisme aquatique : la daphnie.

Serag MF, Kaji N, Gaillard C *et al.* Trafficking and Subcellular Localization of Multiwalled Carbon Nanotubes in Plant Cells. ACS Nano. 2010 ; 5: 493-499.

Cet article étudie les mécanismes d'internalisation de nanotubes de carbone dans des cellules végétales dépourvues de parois.

Van der Ploeg MJC, Baveco JM, Van der Hout A *et al.* Effects of C60 nanoparticle exposure on earthworms (*Lumbricus rubellus*) and implications for population dynamics. Environ Pollut. 2011 ; 159: 198-203.

Cette expérience sur les vers de terre est réalisée dans des sols mais les doses de nanoparticules sont relativement élevées (jusqu'à 154 mg/kg).

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Algae, Bacteria, Earthworm, Ecotoxicology, Fish, Nanoparticles, Plant, Soil, Surface water.

ANNEXE 4

anses
alimentation, environnement, travail

Bulletin de Veille Scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 12 • Février 2011
Notes d'actualité scientifique

Santé / Environnement / Travail



Impact de nanoparticules sur des végétaux

Période : septembre 2009 à décembre 2009

Camille LARUE et Marie CARRIÈRE

CEA de Saclay – Laboratoire Pierre Süe, groupe de toxicologie humaine et environnementale – Gif-sur-Yvette

Mots clés : **Cellules, Écotoxicité, Génotoxicité, Nanoparticules, Nanotubes, Plantes**

L'incorporation de nanomatériaux (nanoparticules, nanotubes...) dans les biens de consommation courante (crèmes solaires, pneus, emballages alimentaires...) entraîne, à terme, leur dissémination dans l'environnement soit par l'usure normale des produits soit à cause d'un mauvais recyclage. D'autre part, des nanoparticules entreraient dans la formulation de certains produits phytosanitaires, leur utilisation conduirait donc à une dissémination volontaire de nanoparticules. Ainsi, les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, air) ainsi que les différentes espèces y vivant (bactéries, animaux, végétaux...) pourraient être contaminés. Les végétaux représentent un point d'entrée potentiel dans la chaîne alimentaire, puisqu'ils constituent une part essentielle de l'alimentation animale et humaine. Il est donc important d'évaluer leur contamination par les nanoparticules.
Les premières études relatant l'impact des nanoparticules sur les végétaux ont été publiées en 2007. Les résultats présentés sont souvent contradictoires. Certains constatent une activation du métabolisme de l'épinard par des TiO_2 (Su *et al.*, 2009) quand d'autres observent des inhibitions d'élongation racinaire ou de la photosynthèse (Racuciu *et al.*, 2009). Une équipe met en évidence l'internalisation racinaire, le transfert aux parties aériennes et la transmission de nanoparticules de carbone d'une génération à l'autre chez le riz (Lin *et al.*, 2009). Les articles commentés dans cette note précisent certains mécanismes conduisant à ces effets.

Les nanotubes de carbone pénètrent l'enveloppe des graines et affectent leur germination et leur croissance

Analyse

Khodakovskaya *et al.* (2009) réalisent une étude sur la pénétration et les effets des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) sur des graines de tomate.
Les expositions sont faites dans un gel contenant des concentrations de 10, 20 et 40 mg/L de MWCNT. Cette exposition entraîne une germination plus rapide (en 3 jours) et plus efficace. Ainsi, après 12 jours d'exposition, 32 % des graines témoin, non exposées, germent, contre 74 et 82 % des graines exposées respectivement à 10 et 40 mg/L de MWCNT. La biomasse totale est 2,5 fois plus importante et la tige plus longue lorsque les graines sont exposées aux MWCNT. En revanche, le système racinaire n'est pas modifié. Une hypothèse des auteurs pour expliquer ces effets est que les MWCNT permettraient une meilleure imbibition[1] de la graine. L'humidité des graines a alors été évaluée : 38,9 % pour les témoins et 57,6 % pour les graines exposées après 2 jours. Une étude par spectroscopie Raman[2] permet d'observer ces nanotubes à l'intérieur de la graine. Ils sont également visibles en Microscopie Électronique à Transmission (MET) dans les racines issues de ces graines germées. Les MWCNT peuvent donc pénétrer l'enveloppe de la racine et augmenter son imbibition d'où une germination et une croissance accrues. Les auteurs supposent que les MWCNT agissent soit en créant des pores dans l'enveloppe de la graine, permettant le passage de l'eau ou qu'ils régulent l'action d'aquaporines[3] comme c'est le cas lors d'un stress anoxique ou de l'exposition à certains métaux lourds.

Commentaire

L'originalité de cet article réside dans le modèle d'étude : aucune étude, à notre connaissance, ne relate les effets des nanomatériaux sur les graines des végétaux. Si la méthode employée pour la production des MWCNT est bien décrite, la caractérisation (taille, état d'agglomération, présence de résidus de catalyseurs de synthèse...) n'est pas étudiée. Pourtant, ces caractéristiques peuvent jouer un rôle très important dans les effets observés, c'est le cas par exemple de la présence de métaux lourds, souvent employés comme catalyseurs de synthèse et dont des résidus contaminent souvent le lot de nanotubes produits. Les auteurs soulignent que les résultats mis en évidence paraissent intéressants dans le cadre de l'utilisation des nanomatériaux en agriculture : ces derniers augmenteraient le rendement de germination des graines. Néanmoins, les nanotubes pénètreraient ensuite dans les racines de la plante. Dans l'état actuel des connaissances de la toxicologie de ces objets, il paraît donc inadéquat de les utiliser à cet effet, car ils pourraient contaminer les végétaux produits.

L'état d'agglomération des nanotubes de carbone conditionne leur toxicité sur une suspension de cellules d'*Arabidopsis* T87

Analyse

Lin *et al.* (2009) évaluent dans cet article l'impact de nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) et de fibres d'amiante sur des cellules isolées d'*Arabidopsis thaliana*. Les cellules sont exposées à des MWCNT mis en suspension dans de l'eau déionisée dans des états d'agglomération différents. Dans le premier cas, aucun traitement supplémentaire n'est adjoint à la préparation : les MWCNT sont agglomérés et le diamètre moyen des agglomérats est de quelques centaines de µm. Dans le second cas, ils sont sonifiés pendant 6 heures et le diamètre des agglomérats est alors réduit à quelques dizaines de µm. Le nanotube individuel a été caractérisé avant sonification (9,5 nm de diamètre, 1,5 µm de long). Une analyse par ICP-MS[4] révèle la teneur en métaux résiduels des nanotubes avant et après sonification. La pureté des nanotubes passe ainsi de 94,7 % de carbone à 95,2 % après sonification.

Après exposition des cellules à ces nano-objets, à raison de 10 mg/L, seules les fibres d'amiante entraînent une modification de la morphologie des cellules. En Microscopie Électronique à Transmission (MET), aucun nanotube n'est observé à l'intérieur des cellules. La masse sèche des cellules est peu modifiée après exposition aux MWCNT agglomérés, cependant elle diminue drastiquement après exposition aux fibres d'amiante et aux MWCNT faiblement agglomérés, traduisant une mortalité cellulaire. Ces mêmes effets sont observés sur la viabilité cellulaire, après 7 jours d'exposition à 10-600 mg/L de MWCNT. Celle-ci diminue lorsque la concentration en MWCNT augmente. D'autre part, la teneur en chlorophylle est plus faible lorsque les cellules sont exposées aux MWCNT que lorsqu'elles sont non exposées ou exposées aux fibres d'amiante. Enfin, une diminution de l'activité de la superoxide dismutase (SOD[5]) est constatée uniquement lorsque les cellules sont exposées aux MWCNT faiblement agglomérés. Ce paramètre atteste d'un stress oxydant dans les cellules exposées. L'amiante n'a pas d'effet sur ce paramètre.

Ainsi, la taille des agglomérats conditionne fortement la toxicité des MWCNT envers les cellules végétales. Fortement agglomérés, ils sont peu toxiques alors que faiblement agglomérés, ils sont hautement toxiques. Leur toxicité est alors supérieure à celle des fibres d'amiante. Les auteurs ne peuvent pas exclure que cette plus forte toxicité soit liée à la différence de teneur d'éléments sous forme de traces. Une hypothèse avancée est que du fait de leur plus faible taille les MWCNT faiblement agglomérés peuvent pénétrer à l'intérieur d'un amas de cellules, s'y accumuler et déclencher une réponse d'hypersensibilité de même qu'elles le feraient pour un agent pathogène, ce qui à terme mène à la mort de la cellule.

Commentaire

Cette étude met en évidence les effets toxiques pour les cellules végétales de MWCNT agglomérés, en rapport avec la taille des agglomérats. Malgré la toxicité des MWCNT, il est rassurant de constater que les nanotubes fortement agglomérés (non sonifiés) sont peu toxiques, car il est fort probable que ce soit leur état en cas de dissémination dans l'environnement. De plus, l'article précise la taille des agglomérats mais on ne sait pas si cette dernière a été mesurée dans l'eau ou dans un milieu biologique, dans lequel les nanomatériaux ont encore plus tendance à s'agglomérer.

Les nanoparticules d'argent sont génotoxiques pour l'oignon (*Allium cepa*)

Analyse

La publication de **Kumari, Mukherjee, Chandrasekaran (2009)** a pour but d'élucider les effets génotoxiques[6] de nanoparticules d'argent sur des cellules du méristème apical[7] d'oignon.

Le diamètre moyen des nanoparticules est inférieur à 100 nm, elles sont dispersées par sonification à haute puissance pendant 30 min dans de l'eau. L'exposition est réalisée sur des racines de plante entière qui sont ensuite analysées par microscopie.

L'observation microscopique indique que l'index mitotique[8] après 4 heures d'exposition diminue graduellement lorsque la concentration en nanoparticules augmente de 25 à 100 µg/L. Il passe ainsi de 60,3 % pour les cellules de racines non exposées à 27,6 % pour les cellules exposées à 100 µg/L. De plus, les cellules qui se divisent semblent bloquées en prophase[9] puisqu'on passe de 97,6 % cellules en prophase chez les témoins à 99,6 % pour les racines exposées à 100 µg/L de nanoparticules d'argent. Enfin, le taux d'aberrations chromosomiques varie selon la concentration en nanoparticules. À 25 µg/L, il n'y a pas de différence significative par rapport au témoin. À 50 µg/L, des dérèglements lors de la métaphase[10], des pontages dans l'ADN et des phénomènes d'adhérence sont observés. Dès 75 µg/L apparaissent des cassures chromosomiques et enfin à 100 µg/L, les auteurs constatent une importante cytotoxicité, qui se traduit par une désintégration complète des parois de nombreuses cellules.

En conclusion, les nanoparticules d'argent sont cyto et génotoxiques pour les cellules de méristème apical d'oignon avec une diminution de l'index mitotique et l'apparition de nombreux dommages à l'ADN lors de la mitose[11].

Commentaire

Peu d'études relatent jusqu'à présent des effets génotoxiques de nanoparticules sur des cellules de plantes. Le modèle utilisé dans cet article est très pertinent puisqu'utilisé dans le cadre du programme international de sécurité chimique de l'OMS.

De plus, les cellules de méristème sont semblables aux cellules souches humaines, c'est-à-dire peu différenciées. Quant aux nanoparticules d'argent, elles sont largement utilisées pour leurs

propriétés antibactériennes et inclues dans la composition de nombreux produits de consommation courante, donc fortement susceptibles de se retrouver dans l'environnement.
Malheureusement, cette étude se contente de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules affichée par le fournisseur qui stipule uniquement un diamètre inférieur à 100 nm. Leur taille réelle, leur possible dissolution et leur état d'agglomération ne sont pas identifiés, autant de critères jugés importants pour évaluer la toxicité de nanoparticules. En particulier, il est reconnu que les nanoparticules d'argent ont fortement tendance à se dissoudre (Pal *et al.*, 1997), les effets observés pourraient donc être uniquement dus aux ions argent dissous. Néanmoins, si les effets observés sont réellement liés à la présence de nanoparticules, les résultats présentés sont préoccupants : si la prolifération cellulaire est bloquée au niveau des méristèmes, la plante ne sera plus approvisionnée en nouvelles cellules et ne pourra plus croître, c'est ainsi l'équilibre des écosystèmes qui serait menacé à terme.

Conclusion générale

Ces études montrent que le consensus n'est toujours pas atteint concernant la phytotoxicité des nanomatériaux. Alors que l'on sait maintenant que les caractéristiques de ces derniers sont primordiales pour déterminer leur potentielle toxicité, il reste encore trop d'études où leurs caractéristiques physico-chimiques ne sont pas détaillées. Il est donc impossible d'attribuer de façon certaine les effets notés (génotoxicité par exemple) à la présence de nanomatériaux. Néanmoins, on peut dégager deux faits importants pour la sécurité sanitaire et de l'environnement. Les nanomatériaux pourraient pénétrer dans les organismes végétaux, s'y accumuler et ainsi entrer dans la chaîne alimentaire. Toutefois, il semble que ces nanomatériaux sous forme agglomérée soient beaucoup moins toxiques que sous forme dispersée, or il est très probable qu'en contact avec leur environnement elles s'agglomèrent.

Lexique

(1) Imbibition : phase au cours de laquelle la graine s'imbibe d'eau avant de reprendre son métabolisme.
(2) Spectroscopie Raman : technique de spectroscopie dont le principe est d'envoyer une lumière monochromatique sur un échantillon et à analyser la lumière diffusée.
(3) Aquaporine : classe de protéines membranaires qui forment des pores perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques.
(4) ICP-MS : pour Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, technique qui permet de mesurer la quantité d'éléments traces dans des échantillons.
(5) SOD : superoxide dismutase, enzyme impliquée dans les processus de régulation du stress oxydant des cellules.
(6) Génotoxique : qui induit des dommages à l'ADN.
(7) Méristème apical : zone de forte division cellulaire située à l'extrémité de la racine.
(8) Index mitotique : il correspond au nombre de cellule en division, c'est-à-dire en mitose.
(9) Prophase : c'est la première étape de la division cellulaire (mitose) pendant laquelle la chromatine se condense pour former les chromosomes.
(10) Métaphase : la métaphase est la deuxième phase de la mitose. C'est le rassemblement des chromosomes à l'équateur de la cellule avant d'être séparés dans les deux cellules filles.
(11) Mitose : elle désigne les événements chromosomiques de la division cellulaire. Ce phénomène permet aux cellules de se multiplier en plusieurs phases successives : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Pendant ces phases, le matériel génétique est dupliqué puis réparti dans deux cellules filles.

Publications analysées

Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M *et al.* Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. ACS Nano. 2009 ; 3(10):3221-7.
Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Sci. Total Environ. 2009 ; 407(19):5243-6.
Lin C, Fugetsu B, Su Y *et al.* Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. J. Hazard. Mater. 2009 ; 170(2-3):578-83.

Publications de référence

Lin S, Reppert J, Hu Q *et al.* Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. Small. 2009 ; 5(10):1128-32.
Pal T, Sau TK, Jana NR. Reversible formation and dissolution of silver nanoparticles in aqueous surfactant media. Langmuir. 1997 ; 13(6):1481-85.
Racuciu M, Creanga D, Olteanu Z. Water based magnetic fluid impact on young plants growing. Romanian Reports in Physics. 2009 ; 61(2):259-68.
Su M, Liu H, Liu C *et al.* Promotion of nano-anatase TiO_2 on the spectral responses and photochemical activities of D1/D2/Cyt b559 complex of spinach. Spectrochimica acta. Part A : Molecular and biomolecular spectroscopy. 2009 ; 72(5); 1112-6.

Revues de la littérature

Mishra VK, Kumar A. Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting Rhizobacteria. Digest J. nanometer. Biostructures. 2009 ; 4 (3):587-92.
Ruffini Castiglione M, Cremonini R. Nanoparticles and higher plants. Caryologia. 2009 ; 62(2):161-5.

Publications non sélectionnées

Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ *et al.* Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and *apoptosis* in *Drosophila melanogaster.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010 ; 242(3):263-9.
Cette publication concerne un insecte et non une plante, sujet de cette note.
Laban G, Nies LF, Turco RF *et al.* The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. Ecotoxicology. 2010 ; 19(1):185-95.
Cette publication concerne un poisson et non une plante, sujet de cette note.
Miao AJ, Schwehr KA, Xu C *et al.* The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ. Pollut. 2009 ; 157(11):3034-41.
Cette publication concerne une algue et non une plante, sujet de cette note.
Tan XM, Lin C, Fugetsu B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. Carbon. 2009 ; 47(15):3479-87.
*Cet article a été écrit par la même équipe que celle concernant les cellules d'*Arabidopsis *qui a été détaillée dans cette note.*
Simon-Deckers AI, Loo S, Mayne-L'hermite M *et al.* Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. Environ. Sci. Technol. 2009 ; 43(21):8423-9.
Cette publication concerne les bactéries qui ne sont pas l'objet de cette note.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Algae, Bacteria, Ecotoxicology, Fish, Plant, Soil, Surface water, Toxicology.

ANNEXE 5

Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants

C Larue[1], H Khodja[2], N Herlin-Boime[3], F Brisset[4], AM Flank[5], B Fayard[6], S Chaillou[7], M Carrière[1]

[1]Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique UMR 9956 CEA-CNRS-IRAMIS, Gif-sur-Yvette, France

[2]Laboratoire d'Etude des Eléments Legers, UMR 9956 CEA-CNRS-IRAMIS, Gif-sur-Yvette, France

[3]Laboratoire Francis Perrin URA 2453 CEA-CNRS-IRAMIS, 91191 Gif-sur-Yvette, France

[4]Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, UMR8182 CNRS-Univ. Paris sud, Orsay, France

[5]LUCIA beamline, SOLEIL synchrotron, Saint-Aubin, France

[6]Laboratoire de Physique du solide, Orsay, France and ID21 beamline, ESRF, Grenoble, France

[7]Unité de Nutrition Azotée des Plantes, INRA, Versailles, France

E-mail: marie.carriere@cea.fr

Abstract. Nanoparticles (NP) are introduced in a growing number of commercial products and their production may lead to their release in the environment. Plants may be a potential entry point for NP in the food chain. Up to now, results describing NP phytotoxical effects and plant accumulation are scarce and contradictory.

To increase knowledge on titanium dioxide NP (TiO_2-NPs) accumulation and impact on plants, we designed a study on three plant species, namely wheat (*Triticum aestivum*), oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*. These plants were exposed in hydroponics to a panel of well-characterized TiO_2-NPs, with diameters ranging from 12 to 140 nm, either anatase or rutile. Their accumulation in plant tissues is currently being assessed by complementary imaging techniques: scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), micro-X-ray

fluorescence (SR-µ-XRF) imaging and micro-particle induced X-ray emission (µ-PIXE) imaging. Moreover, the impact of TiO_2-NP exposure on germination rate, root elongation, dry biomass and evapotranspiration is evaluated. Preliminary results are presented here, with data collected on wheat plants exposed to 12 nm and 25 nm anatase TiO_2-NPs. These results show that TiO_2-NPs are taken up by plants, and do not significantly alter their germination and root elongation. These results underline the necessity of deeper evaluation of nanoparticle ecotoxicity, and particularly on their interaction with plants.

1. Introduction

Nanoparticles (NP) are introduced in a growing number of commercial products. Among them, TiO_2 anatase nanoparticles (TiO_2-NPs) are one of the most produced NPs in the world (see Nanowerk database, www.nanowerk.com). They are used as a pigment in paint, paper, ink and plastic. They are also introduced in cosmetics such as sunscreens for their UV protective properties (see Nanowerk database, www.nanowerk.com). Finally, they are presently used in pilot water-purification reactors, because of their ultraviolet irradiation-induced bactericidal effects (photocatalysis). For these reasons, these NPs will surely be released in the environment (Gottschalk *et al.*, 2009). The knowledge of their potential effects on human health is rapidly increasing, however little is known on their potential toxicological effects on environment, *i.e.* destabilization of the ecosystems and trophic transfer, but also on their potential transfer to the food chain *via* plant ingestion. The literature relating NP toxicity and accumulation in plants is scarce; authors mostly relate NP inhibitory effects on seed germination and root elongation (Lin and Xing, 2007; Lin and Xing, 2008; Yang *et al.*, 2006). A few studies relate NP uptake by plant roots (Lin and Xing, 2008; Zhu *et al.*, 2008), and root to shoot transfer (Zhu *et al.*, 2008). Concerning TiO_2-NPs, TiO_2-based nanocomposites have recently been shown to be accumulated and translocated to the shoots of *Arabidopsis thaliana* (Kurepa *et al.*, 2010). These translocation studies are based on elemental analysis of the ionic form of metal in plants, but neither address the presence of metal as NPs, nor the spatial distribution of NPs throughout the plant. Actually, TiO_2-NP dissolution has been demonstrated to be low in aqueous solution (Schmidt and Vogelsberger, 2009), however its occurrence has never been tested in plant exposure solution and/or during NP transfer to the roots or from the roots to the shoots. Synchrotron radiation micro X-ray fluorescence (SR-µ-XRF), coupled to micro X-ray absorption spectroscopic (µ-XAS) analysis is the ideal method to address metal distribution after plant uptake, together with speciation analysis which would permit the identification of this metal as NPs. It has already been used to assess ionic metal internalization and distribution in plants (Isaure *et al.*, 2006).

We used a combination of complementary imaging techniques: scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), micro-X-ray fluorescence (SR-µ-XRF) imaging and micro-particle induced X-ray emission (µ-PIXE) imaging, to assess TiO_2-NP accumulation in plants, and correlated their uptake with their impact on plant development. This study is currently under process in our laboratory with several plant models and several TiO_2-NPs varying in their diameter, crystalline phase and shape; we present here some preliminary results obtained on wheat (*Triticum aestivum*), exposed in hydroponics to 12 nm and 25 nm anatase TiO_2-NPs. These results show that TiO_2-NPs are taken up by plants, and do not significantly alter their germination and root elongation.

These results underline the necessity of deeper evaluation of nanoparticle ecotoxicity, and particularly on their interaction with plants.

2. Methods

2.1. Nanoparticles, characterization and suspension

For TiO_2-NP dispersion studies and impact studies on plant development, we used commercial Evonik Aeroxide® P25 TiO_2-NPs. The NPs used in plant uptake experiments were synthesized by laser pyrolysis in Laboratoire Francis Perrin (LFP) (Pignon *et al.*, 2008), then annealed under air at 400°C during 3 h. Physico-chemical characterization of these NPs has been reported in two previous studies (Simon-Deckers *et al.*, 2008; Simon-Deckers *et al.*, 2009). Briefly, LFP NPs are 95% anatase and 5% rutile. Their mean diameter is 12 ± 3 nm, they are spherical-shaped and their specific surface area, measured according to Brunauer, Emmett and Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938), is 82 ± 4 $m^2.g^{-1}$. Their point of zero charge, measured by assessment of zeta potential at increasing pH, is 6.4. Evonik P25 nanoparticles are 75% anatase and 25% rutile. Their mean diameter is 25 ± 7 nm, they are spherical-shaped and their specific surface area, measured according to Brunauer, Emmett and Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938), is 46 ± 1 $m^2.g^{-1}$. Their point of zero charge is 7.

These TiO_2-NPs were suspended in ultrapure water and sonicated using a high energy probe, during 30 mn, at 4°C, in pulsed mode (1 s on, 1 s off). Agglomeration status was evaluated using photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer 3000HS (Malvern). Z-average values are given in the result section.

2.2. Plant exposure and sample preparation for imaging

For imaging, seeds were germinated on sand, and their roots were directly immersed in the NP suspension (100 $mg.L^{-1}$), and placed in a growth chamber under controlled conditions: day/night photoperiod: 16/8 h; temperature (day/night), 24/20 ± 1°C and relative humidity (day/night), 70/75%. After 7 days, plant roots were thoroughly rinsed with deionised water. For µ-XRF, SEM and µ-PIXE analysis, plant roots and leaves were cryofixed, immediately embedded in Tissue Tek OCT™ resin (Agar Scientific, Essex, UK) and cross sections were cut and freeze-dried.

The distribution of Ti, P, Cl and Ca in plant thin sections were mapped using synchrotron radiation µ-X-ray fluorescence (SR-µ-XRF), images presented in this study were recorded on LUCIA beamline (SOLEIL synchrotron, France). The spot size was 3 × 3 μm^2. XAS spectra were recorded between 4.95 and 5.05 keV, *i.e.* around Ti X-ray absorption edge (4.966 Kev). On each sample, at least 10 spectra were collected, *in situ* on map locations containing high concentrations of Ti. These spectra were then averaged and compared to XAS spectra collected on Ti standards: 12 nm, 25 nm and 140 nm TiO_2 anatase NPs, 20 and 50 nm TiO_2 rutile NPs. Spectrum was then normalized to the second-order polynomial to be equal to one, with Athena software (Ravel and Newville, 2005). SEM image were acquired on a Zeiss-Supra 55VP Field Emission Gun Scanning Electron Microscope

(FEG-SEM) equipped with a X-ray Energy Dispersive Spectrometer (EDS), operated at 15 kV, at ICMMO, Orsay, France.

2.3. Nanoparticle impact on plant development

For NP impact on plant development assessment, 10 seeds were germinated in Petri dishes in deionised water containing 10 to 100 mg/L NPs. According to US-EPA guidelines (US-EPA, 1996), seeds with roots longer than 5 mm were considered germinated. For root elongation experiment, after 7 days, roots were measured on a picture thanks to ImageJ software.

3. Preliminary results and discussion

3.1. Characterization of TiO_2-NPs and dispersion in aqueous solution

In order to obtain properly dispersed and stable TiO_2-NP suspensions, sonication was applied to TiO_2-NP powders dispersed in water at 10 $g.L^{-1}$. For this study, TiO_2-NPs from Evonik (Aeroxide® P25) were used. Optimal TiO_2-NP concentration for proper measure was evaluated, and concentrations of 50-1000 $mg.L^{-1}$ were found to be appropriate, whereas at lower concentrations, the zetasizer was not able to properly measure the mean hydrodynamic diameter (Table 1). At concentrations higher than 1000 $mg.L^{-1}$, the suspension is too opaque to obtain a proper measure.

Table 1. Mean hydrodynamic diameter of nanoparticle agglomerates[a]

Concentration ($mg.l^{-1}$)	10	50	100	500	1000	2000
Diameter (nm)	1400.6	24.2	38.7	43.1	66.6	12.5
Standard deviation	333.4	11.1	15.4	22.6	26.1	7.3

[a]Mean hydrodynamic diameter was determined by PCS after a 30 mn sonication, in water, using high energy probe. TiO_2-NP concentration in these suspensions ranged from 10 to 2000 $mg.l^{-1}$.

When diluted in Hoagland medium, these suspensions of TiO_2-NPs immediately agglomerated. To prevent agglomeration, various dispersing agents were tested. The obtained suspensions are presented in Figure 1, which shows that NP agglomeration occurs in most conditions. Mean hydrodynamic diameters of TiO_2-NP agglomerates are presented in Table 2.

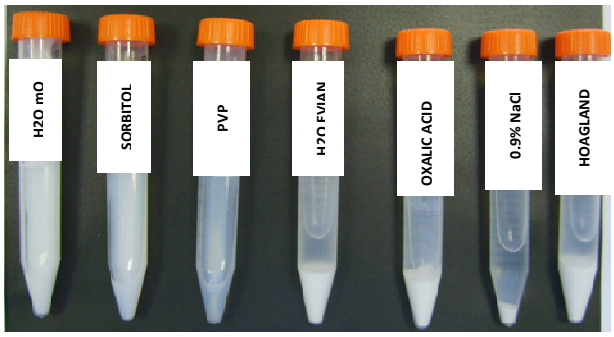


Figure 1. TiO_2-NP suspensions, use of a dispersing agent. From left to right: TiO_2-NPs sonicated in water, sorbitol, 1 $g.l^{-1}$ PVP, Evian water, oxalic acid, 0.9% NaCl, or sonicated in water and then diluted in Hoagland medium.

Table 2. Mean hydrodynamic diameter of NP agglomerates when using a dispersing agent[a]

Dispersing agent	20 mM oxalic acid	1 $g.l^{-1}$ PVP	10 $g.l^{-1}$ PVP	1 mM sorbitol	0.9% NaCl	Evian water
After sonication	1536	46	245	41	1000	1668
Hoagland	1234	896	41	853	1126	746

[a]Mean hydrodynamic diameter was determined by PCS at 50 mg/L after a 30 mn sonication, in water containing a dispersing agent (oxalic acid or polyvinylpyrrolidone (PVP) or sorbitol or in physiologic serum (0.9% NaCl) or Evian water). Diameters are determined directly after sonication, or after sonication and dilution in Hoagland medium.

As regards these dispersion results, and considering that we aimed at exposing plants in a well-dispersed TiO_2-NP suspension, we chose to expose plants in TiO_2-NPs prepared in water without addition of any dispersing agent, which would not increase suspension quality.

3.2. Impact of TiO_2-NPs on plant development

The impact of TiO_2-NP exposure on plant development was evaluated on wheat seeds and plantlets, exposed to Evonik (Aeroxide® P25) TiO_2-NPs. Exposure did not induced any statistically significant modification in wheat seed germination (Figure 2B), nor in root elongation (Figure 2C). However, during root development, TiO_2-NPs strongly stuck onto roots and agglomerated in exposure medium (water, Figure 2A).

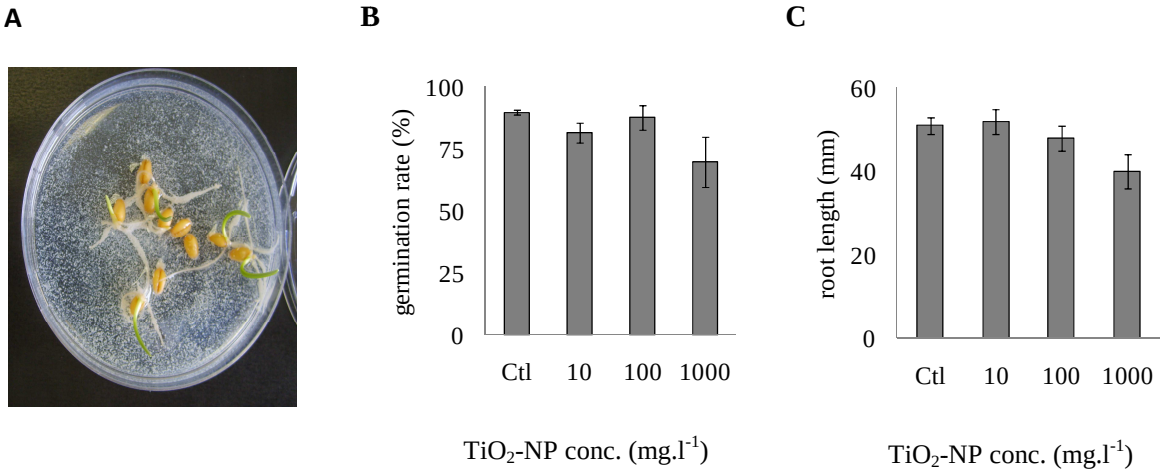


Figure 2. Seed germination test. Wheat seeds were exposed to Aeroxide® P25 TiO_2-NPs (A), and number of germinated seeds was counted (B), then the mean length of roots was measured (C).

3.3. TiO_2-NP accumulation in plants

Elemental analysis, in scanning mode, enabled to draw images of P content, representative of plant tissues, and of Ti content, representative of TiO_2-NPs, in plant roots and leaves after exposure. An example is presented in Figure 3, mapped on wheat plant roots after exposure to anatase, 12 nm TiO_2-NPs. We used these nanoparticles rather than Evonik nanoparticles because they were smaller, and thus would more probably be taken up by plants. Their agglomeration status and impact on plant development was close to that of Evonik nanoparticles (not shown). After 7 days of exposure, Ti was observed in the parenchyma of wheat roots (Figure 3, arrows), but also in the vascular cylinder, demonstrating that TiO_2-NPs were transferred from the exposure suspension to vegetal tissues.

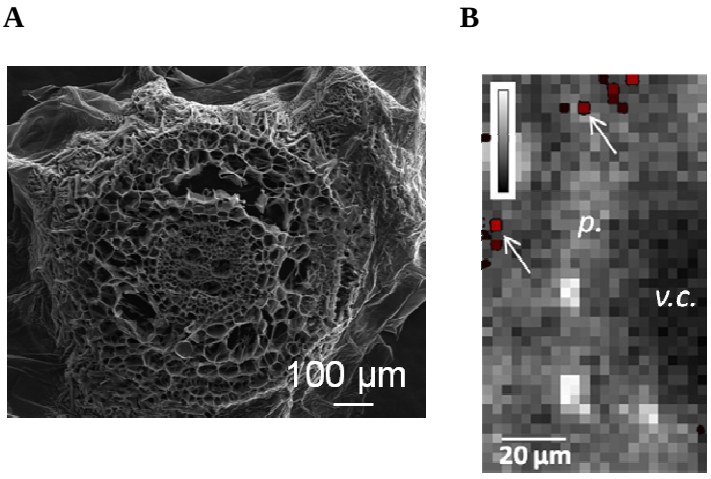


Figure 3. Ti distribution in wheat roots. Transversal sections of a root analyzed by SEM (A) and by µ-XRF image of a region related to the white square in A (B) after a 7-day exposure to 12 nm anatase TiO_2-NPs. In B: maps of P distribution (gray) and Ti distribution (red, clusters are also indicated by arrows) are superimposed. SEM image was recorded in ICMMO and µ-SR-XRF image on LUCIA beamline, SOLEIL synchrotron.

As described in several publications, Ti pre-edge features are characteristic of the crystalline phase and size of TiO_2-NPs. Anatase displays a typical triplet feature (A1, A3 and B peaks), with a weak

shoulder on the low-energy side of the central A3 peak (A2) (Wu *et al.*, 2002). The intensity of A2 peak is related to the distortion of the octahedral TiO_6 unit, particularly the distortion observed on the surface of NP. The intensity of this peak is thus related to the size of the particle: the smaller the NP, the higher this A2 peak (Luca *et al.*, 1998). Meanwhile, the intensity of the A1 peak also decreases as the particle size decreases (Chen *et al.*, 1997). Analysis of this pre-edge region may then inform on changes in the crystalline phase of NPs after cellular internalization, and on their dissolution. In the present experiment, no modification of these pre-edge features was observed after plant internalization of anatase TiO_2-NPs (Figure 4), meaning that Ti is still in the nanoparticulate TiO_2 chemical form inside plants, and that their crystalline phase did not change. Moreover the size of NPs remained constant after plant internalization meaning that no partial dissolution of NPs occurred.

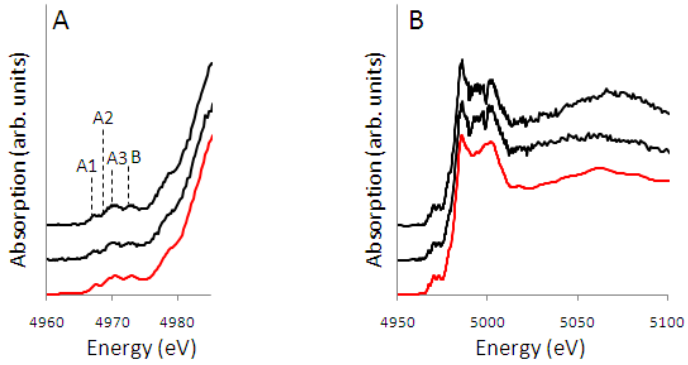


Figure 4. XANES spectra of Ti in plant roots exposed to TiO_2-NPs. Plants were exposed for 7 days to anatase TiO_2-NPs. Spectra were recorded at the Ti K-edge (4.966keV) at room temperature, locally on two Ti-rich regions determined on µ-SR-XRF maps (black spectra), and compared to the spectrum of a reference compound (red spectrum). A: pre-edge feature; B: XANES spectra. Image recorded on LUCIA beamline, SOLEIL synchrotron.

In the post-edge region, the oscillations show some differences in the samples as compared to reference compounds. However these spectra are noisy and their interpretation is difficult. Still, these changes may be due to surface modifications of TiO_2-NPs exposed to root exudates or plant fluids. A future experiment will aim at studying these changes which may occur in these conditions.

3. Conclusion

We determined sonication conditions enabling to properly disperse anatase NPs, the conclusion is that dispersion has to be performed in water, by ultra-sonication during 30 min. In these conditions, dilution in Hoagland medium leads to agglomeration, and none of the dispersing agent studied permits to maintain a stable dispersion.

Plant exposure to anatase, 25 nm NPs neither affect their seed germination rate, nor their root elongation. However 12 nm anatase NPs are efficiently taken up by plant roots and localize in the

parenchymal region and vascular cylinder. Their nutrient solution-to-root transfer do not induce their dissolution, nor localized change in their crytalline structure.

µPIXE experiment are under process and will permit to have a global view of the perturbations in major elements homeostasis which may be caused by TiO_2-NP uptake. Moreover, on all these plant samples, transmission electron microscopic observations will now enable to evaluate if isolated NPs are taken up by plants, or if these NPs are grouped into clusters. The present results prove that TiO_2-NPs can be transferred to plants by their roots in case of an accidental release in the environment, and consequenltly may enter the food chain.

Acknowledgements

This work was funded by ADEME, CEA and the region Ile de France through the C'Nano framework. The authors would like to thank the European Synchrotron Radiation Facility and SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities at ID21 and LUCIA. This work was performed in the framework of the iCEINT research consortium.

ANNEXE 6

Comparative uptake and impact of TiO_2 nanoparticles in wheat and rapeseed

Camille Larue[1], Giulia Veronesi[2], Anne-Marie Flank[3], Suzy Surble[4], Nathalie Herlin-Boime[5], Marie Carrière[1,6,*]

[1]UMR3299 CEA-CNRS-IRAMIS, Service Interdisciplinaire des Systèmes Moléculaires et Matériaux, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. camille.larue@cea.fr, marie.carriere@cea.fr

[2]European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), ID21 beamline, B.P. 220, 38043 Grenoble, France. giulia.veronesi@esrf.fr

[3]LUCIA beamline, SOLEIL, Saint Aubin, B.P. 48, 91192 Gif sur Yvette, France. anne-marie.flank@synchrotron-soleil.fr

[4]UMR3299 CEA-CNRS-IRAMIS, Service Interdisciplinaire des Systèmes Moléculaires et Matériaux, Laboratoire d'Etude des Eléments Légers (LEEL), Gif-sur-Yvette, France. suzy.surble@cea.fr

[5]URA2453 CEA-CNRS-IRAMIS, Service des Photons, Atomes et Molécules, Laboratoire Francis Perrin (LFP), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. nathalie.herlin@cea.fr

[6]Permanent address: UMR E3 CEA-Université Joseph Fourier-INAC, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN), 38054 Grenoble Cedex 9, France.

*To whom correspondence should be addressed: Marie Carrière, CEA Grenoble, INAC/SCIB/LAN, 17 rue des Martyrs, Bât C5, pce 632, 38054 Grenoble Cedex 9, France. +33 4 38 78 03 28. marie.carriere@cea.fr

ABSTRACT

Up to 2 million tons per year of TiO_2 nanoparticles (NPs) are produced worldwide. This intensive production would lead to their release in the environment and contamination of soils and plants; still few articles relate TiO_2-NPs uptake and impact on plants. In this study wheat and rapeseed plantlets were exposed to 14 nm or 25 nm anatase TiO_2-NPs in hydroponics conditions, either through root exposure or leaf exposure. Micro particle-induced X-ray emission (μPIXE) coupled with Rutherford backscattering spectroscopy (RBS) was used to quantify absorbed titanium. Micro X-ray fluorescence (μXRF) based on synchrotron radiation was used to evaluate Ti distribution in roots and leaves. Our results show that both TiO_2-NPs are accumulated in these plantlets upon root exposure and that Ti content is higher in rapeseed than in wheat. Ti distribution in root cross sections depends on NP agglomeration state. NPs are also accumulated in plantlets upon leaf exposure. Finally we show that TiO_2-NP exposure induces increased root elongation but does not affect germination, evapotranspiration and plant biomass. Taken together, these results confirm that TiO_2-NPs may be accumulated in plant crops but only moderately impact plant development. Moreover we provide for the first time quantitative information on TiO_2-NPs accumulation in wheat and rapeseed upon hydroponics exposure.

INTRODUCTION

Over the last ten years, the field of nanotechnologies rapidly evolved. Nanoparticles (NPs) are now contained in consumer goods such as sportswear, food packaging or electronics. In 2005, 54 products containing NPs were commercialized; in 2010, they were 1317 (www.nanotechproject.org). Over ten million tons of NPs are produced in the world every year, and among them TiO_2-NPs production reaches 2 million tons per year over the world (AFSSET, 2010). This growing production and use of NPs will lead to their release in the environment. Researchers have simulated the end of life cycle of nanoproducts and their conclusion is that TiO_2-NPs are of the greatest concern for the environment (Gottschalk *et al.*, 2009). Annual increase in TiO2 content in soil and sediments amended with sludge will reach 89 and 358 μg TiO_2/kg, respectively. These NPs can be released from cosmetics such as sunscreens or from paints. For instance a study has evidenced that a home facade painted with a paint containing TiO_2-NPs can release up to 10 μg Ti/L after a rainfall event (Kaegi *et al.*, 2008). In the worst case the following scenario is that these NPs will reach wastewater treatment plants and rivers. River water would then be used to water agricultural crops leading to foliar contamination. TiO_2-NPs will also be deposited on soils where they would exhibit different behaviors according to soil texture. In sandy soil TiO_2-NPs are mobile and can go through soil column up to 370 cm depth (Fang *et al.*, 2009) possibly leading to plant root contamination. Finally another issue of NP contamination is their transfer to trophic chains. Judy et al. proved that hornworms fed with tobacco plantlets grown in hydroponics in gold NPs suspension accumulate gold throughout their body (Judy *et al.*, 2011). It is thus all the more important to determine TiO_2-NP fate and impact on plants and more generally on the environment.

Two studies relate TiO_2 uptake in plants grown in hydroponics upon root exposure. The first one describes the internalization of TiO_2 nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana* plantlets (Kurepa *et al.*, 2010). We also proved in a previous study that TiO_2-NPs up to 20 nm are internalized in wheat roots and transferred to leaves without modification of their crystalline structure (Larue *et al.*, submitted). In these two studies, no quantitative data on NP accumulation were provided. Note that to the best of our knowledge there are no published data relating TiO_2 accumulation in plants upon foliar exposure.
Several studies report TiO_2 impact on plant development and physiology. Their outcome is contradictory. TiO_2-NPs are either found to be phytotoxic (Asli and Neumann, 2009; Castiglione *et al.*, 2011) or not (Garcia *et al.*, 2011; Seeger *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2005; Larue *et al.*, submitted). Unfortunately in most of these studies NP physicochemistry is not deeply characterized and consequently results cannot be compared.
The goals of the present study were i) to compare the behavior of two plants exposed to TiO_2-NPs, ii) to provide quantitative data of TiO_2 accumulation and distribution in roots according to their size, iii) to analyze TiO_2 impact on plant development according to their size, iv) to determine if TiO_2-NPs can be internalized in plants upon foliar exposure. We report the internalization, root-to-shoot translocation and impact of TiO_2-NPs on two plants of agronomical interest: wheat and rapeseed, grown in hydroponics. Indeed, these two plant species are part of the human and cattle nutrition. Rapeseed is also used to manufacture biofuels. Moreover, these two plant species belong to the two angiosperm families: monocots (wheat) and dicots (rapeseed). These plants were exposed to deeply characterized TiO_2-NPs with two different diameters in order to evaluate if the nominal diameter can influence NP accumulation and impact.

METHODS

Nanoparticle Preparation

TiO_2-NPs were synthesized by laser pyrolysis in Laboratoire Francis Perrin, CEA Saclay (Pignon *et al.*, 2008) or were purchased from Evonik (formerly Degussa) (Aeroxide TiO_2 P25; 25 nm TiO_2-NPs). These NPs were precisely characterized using transmission electron microscopy (TEM; Philips EM 208) for their shape and nominal diameter, X-ray diffraction (XRD) for their crystalline phase, Brunnauer-Emmet-Teller (BET) method (Brunauer *et al.*, 1938) for their specific surface area (ssa). For plant exposure, NPs were dispersed in ultrapure water by pulsed ultrasonication (30 min; Autotune 750W, Bioblock Scientific) at 10 g/L (Simon-Deckers *et al.*, 2008). Their agglomeration state, zeta potential and point of zero charge (PZC) were determined using a Malvern ZetaSizer (3000HS, Worcestershire, UK).

Plant Culture and Exposure

Seeds of rapeseed (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum*) were germinated on moistened sand for 15 days after being sterilized with $Ca(ClO)_2$ (1%). They were then transferred into individual tubes to be grown in hydroponics. Great care was taken to avoid

contamination of non-exposed organs by NPs during exposure and preparation steps for analysis techniques (Larue *et al.*, submitted).

Either plant roots or plant leaves were exposed to NPs. For root exposure, 15 mL of a 100 mg/L NP suspension were dispensed in individual tubes, each containing one plantlet. For leaf exposure, plants were grown in Hoagland solution (0.5 mM $MgSO_4$, 2.5 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.5 mM KH_2PO_4, 2.5 mM KCl, 25µM H_3BO_3, 5µM $MnSO_4$, 0.4 µM $ZnSO_4$, 0.2 µM $CuSO_4$, 0.25 µM Na_2MoO_4, 4 µM Fe-Na-EDTA, pH 5.5) and one leaf was immerged in aqueous TiO_2 suspension (100 mg/L). All experiments were carried out in a growth chamber under controlled conditions: day/night photoperiod (16/8 h), day/night temperature (24/20 ± 1 °C) and day/night relative humidity (70/75 %).

After a one week exposure, roots and leaves were thoroughly washed with ultrapure water and cryofixed in chilled isopentane (-160°C) before being embedded in Tissue Tek OCT™ resin (Agar Scientific, Essex, UK). Thin sections (50 µm) were cut using a cryotome (Leica Ultracut 5, France) and freeze-dried before analysis.

Ti Distribution Imaging and Quantification on Synchrotron beamline and Nuclear Microprobe

Ti distribution was investigated by micro X-Ray Fluorescence (µXRF) mapping on ID21 (European Synchrotron Radiation Facility, ESRF) and LUCIA (SOLEIL synchrotron) beamlines. This technique is used to measure trace element concentration down to a few ppm, and to map their distribution. Maps were recorded with a pixel size of 1 x 1 µm² on ID21 and 5 x 5 µm² on LUCIA. Data were processed using PyMCA (Sole *et al.*, 2007).

Distribution of endogenous elements (K, Mn, Fe, Cu, Zn…) and Ti was also mapped by micro particle induced X-ray emission (µPIXE) coupled with Rutherford backscattering spectroscopy (RBS) and scanning transmission ion microscopy (STIM) performed simultaneously on the nuclear microprobe of SIS2M laboratory (Khodja *et al.*, 2001). PIXE spectra were collected using a 30 mm² silicon drift X-ray detector positioned at 20 mm and 45° from the sample surface. A 150 µm Mylar® film was inserted between the sample and the detector to stop backscattered protons and attenuate X-rays from light elements. A 3 MeV proton beam was focused to 1 x 1 µm² with an average intensity of 200 pA for imaging. Areas of 200 x 200 µm² were mapped. These areas contained parts of epidermis, parenchyma and vascular cylinder (roots) or epidermis, parenchyma and nerve (leaf). Images were processed using RISMIN (PIXE) and RISTIM (STIM) softwares (Daudin *et al.*, 2003). For quantification, the beam was focused to 2 x 2 µm² with an average intensity of 800 pA. Three zones of 25 x 25 µm² were analyzed for 30 min in each area of interest. Data were processed using SIMNRA (Mayer, 1999) and Gupix (Campbell *et al.*, 2000) softwares.

Impact of NPs on Plant Development

Plant development after NP exposure was studied through germination rate, root elongation, dry biomass and evapotranspiration (ETP). Ten seeds per Petri dish were germinated in NP suspensions (0, 10, 50 and 100 mg/L), in triplicate. After 7 days, germination rate and root length were measured as recommended in US-EPA guidelines (US-EPA, 1996). Five plants per condition were then transferred in individual tubes filled with Hoagland solution to pursue their growth for one more week. At the end of the experiment, plants were dried for 48 h and their dry biomass was recorded. ETP was evaluated by measuring the remaining culture medium in each exposure tube.

Statistical Analysis

All experiments contained at least three replicates (up to five) and were reproduced independently three times. Significant difference was determined by the non parametric test of Kruskall-Wallis with $p<0.05$.

RESULTS

Nanoparticle Characterization

The main characteristics of TiO_2-NPs are described in the Table 1. These two NPs were majorly anatase, and their mean nominal diameter was either 14 nm or 25 nm. Their specific surface areas were 92 and 50 m^2/g for 14 nm and 25 nm TiO_2-NP, respectively. After sonication in ultrapure water these NPs had very different hydrodynamic diameters, which is a measurement of their dispersion status. The mean hydrodynamic diameter of 25 nm TiO_2-NPs was 27 nm, which is close to their nominal diameter, proving that this NP was well dispersed. Some agglomerates persisted in the suspension of 14 nm TiO_2-NP; their hydrodynamic diameter was 229 nm. The zeta potential of these two NPs was -12.6 mV for 14 nm TiO_2-NP and -10.5 mV for 25 nm TiO_2-NP.

Table 1: Nanoparticle characterization[a]

	Diam. (nm)	Crystal. phase	Ssa (m^2/g)	Hydrodynamic diameter	ζ (mV)	PZC
"14 nm"	14.3 ± 1.8	95% anat.	92 ± 3	229 ± 48	-12.6 ± 1.0	5.03
"25 nm"	25.2 ± 5.7	89% anat.	50 ± 0	27 ± 7	-10.5 ± 2.6	4.92

[a]*Crystal. phase: crystalline phase, ssa: specific surface area, PZC: point of zero charge, anat.: anatase, ζ: zeta potential.*

Root exposure – TiO_2 internalisation in roots

Ti accumulation in wheat and rapeseed roots upon root hydroponics exposure was investigated by µPIXE/RBS (Figure 1). The STIM pictures (Figure 1A, E, I, M) is a measure of the local thickness of the sample. K is an essential component of plants; its distribution (Figure 1B, F, J, N) thus depicts plant structure. Finally, Ti distribution (Figure 1C, G, K, O) and STIM+Ti pictures (Figure 1D, H, L, P) made it possible to precisely localize Ti in the plant sections.

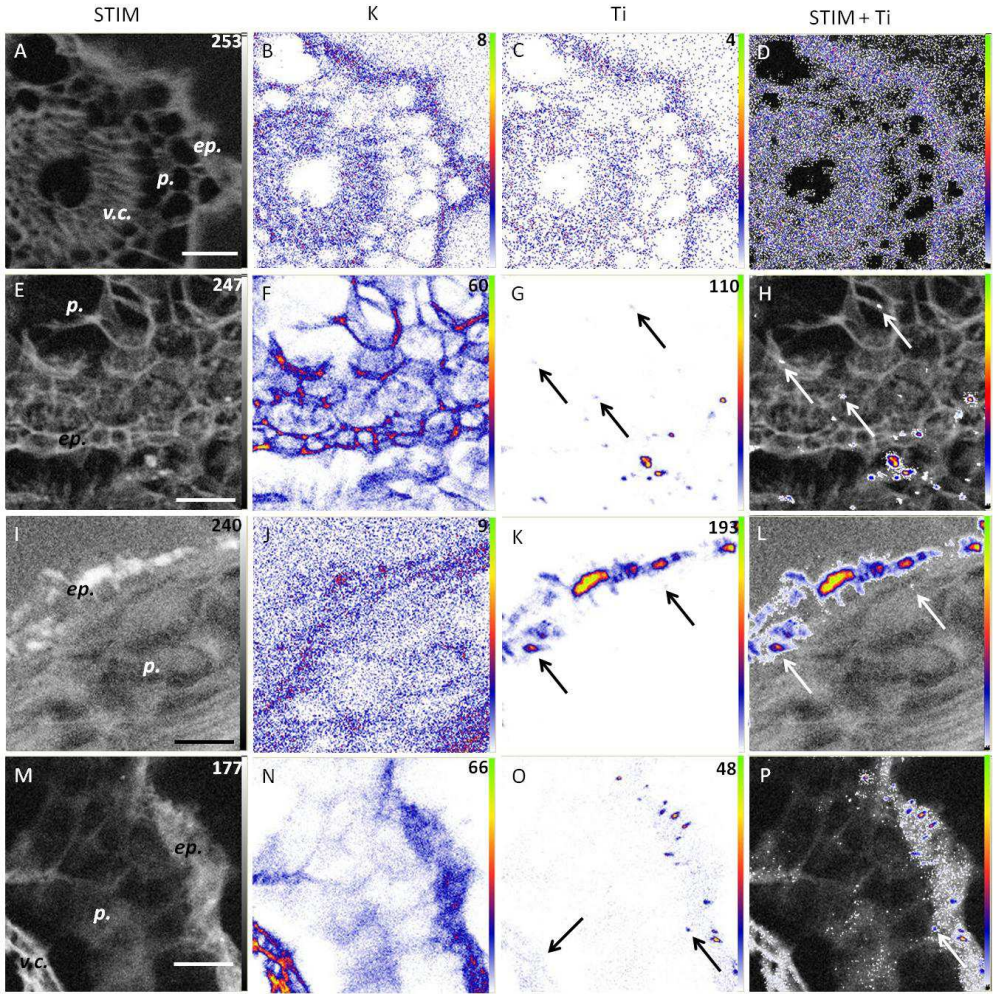


Figure 1: Ti distribution in roots of wheat and rapeseed upon root exposure, analyzed by µPIXE. Images of STIM (A, E, I, M), potassium distribution (B, F, J, N), titanium distribution (C, G, K, O) and titanium distribution superimposed on STIM (D, H, L, P) were drawn. Root sections of wheat grown in ultrapure water (A-D), exposed to 14 nm TiO_2-NP suspension (100 mg/L) (E-H) or to 25 nm TiO_2-NP suspension (100 mg/L) (M-P). Rapeseed root sections exposed to 14 nm TiO_2-NP suspension (100 mg/L) (J-L). Color scales on STIM, K and Ti distribution maps are in arbitrary units and represent the maximal Ti count in the sample. Scale bar = 50 µm. Arrow: Ti-rich region, vc. vascular cylinder, p. parenchyma, ep. epidermis.

Root of control plantlets, grown in ultrapure water, had a very low Ti signal with a homogeneous distribution; it can be considered as Ti background (Figure 1A-D). Roots exposed 14 nm TiO_2-NPs contained high amounts of Ti (Figure 1E-L). High Ti content was

observed on root epidermis. Moreover Ti hot-spots were observed in plant roots, in the parenchymal region (Figure 1, arrows).

To evaluate the influence of NP primary diameter on root accumulation, wheat plantlets were then exposed to 25 nm TiO_2-NPs (Figure 1M-P). The same Ti distribution pattern was observed, but parenchyma of roots exposed to 25 nm TiO_2-NPs contained less Ti-rich regions than parenchyma of roots exposed to 14 nm TiO_2-NPs.

In order to gain sensitivity and to more precisely identify Ti distribution in plant roots, we mapped Ti content in root sections by µXRF (Figure 2): in green, K distribution represents plant structure and in red Ti distribution is superimposed. The scale indicates the Ti fluorescence count per pixel. The same Ti distribution pattern ws obtained using this imaging technique. In comparison with control plants (Figure 2A, D), Ti was internalized in exposed roots of both wheat and rapeseed (Figure 2B, C, E). It was found mostly in the parenchymal region. Thanks to this highly sensitive technique we also observed Ti in wheat vascular cylinder (Figure 2C). In rapeseed Ti was observed on the epidermis and in plant parenchyma, very close to the vascular cylinder of roots (Figure 2E).

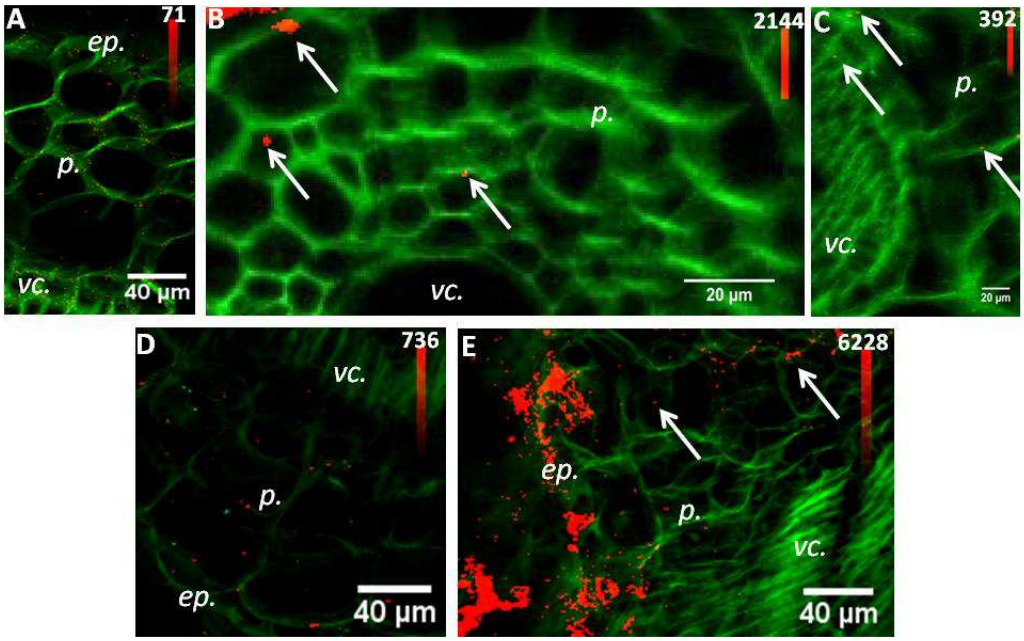


Figure 2: Ti distribution in roots of wheat and rapeseed upon root exposure, analyzed by µXRF. Roots were grown in water (A-D) or exposed to 100 mg/L TiO_2 suspensions: 14 nm TiO_2-NPs (B) or 25 nm TiO_2-NPs (C, E). Images were recorded on ID21 beamline (pixel size: 1 x 1 µm²). Potassium distribution (green) represents plant tissues, in red, titanium distribution. Color intensity scale is proportional to the fluorescence counts of Ti, and the maximum number of counts is reported. Arrow: Ti-rich region, ep. epidermis, p. parenchyma, vc. vascular cylinder.

Since micro-PIXE/RBS/STIM is a quantitative method, we locally quantified Ti content in plant roots. Epidermis, parenchyma and vascular cylinder regions were delimitated using the µPIXE images and Ti content in each region was measured. These local analyses were performed on wheat and rapeseed roots exposed to 100 mg/L of 14 nm or 25 nm TiO_2-NPs

(Figure 3). Ti background content in roots was determined by quantification of Ti in roots of plants grown in ultrapure water (Ctl). Ti content in the parenchyma of control rapeseed was higher than in control wheat, with 22 mg Ti/kg Dry Matter (DM) and 2 mg Ti/kg DM, respectively. In both plant species, Ti content in roots exposed to 14 nm TiO_2-NPs was significantly higher than Ti content in control roots: in the parenchymal region Ti content was multiplied by 4 or 20 in rapeseed and wheat, respectively. For both plant species, Ti was mostly found in the parenchyma rather than in the vascular cylinder. In wheat, 8 mg Ti/kg DM was measured in the vascular cylinder while it reached 36 mg Ti/kg DM in the parenchyma. In rapeseed, Ti contents were 24 and 85 mg Ti/kg DM in vascular cylinder and parenchyma, respectively.

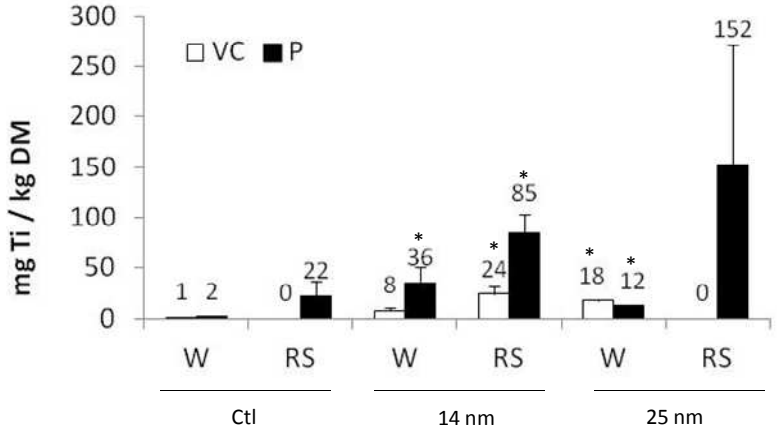


*Figure 3: Ti quantification in roots by µPIXE/RBS in wheat (W) and rapeseed (RS) vascular cylinder (VC) and parenchyma (P). Roots were exposed to ultrapure water (Ctl) or 100 mg/L of TiO_2 suspension of 14 nm or 25 nm TiO_2-NPs. *p<0.05 as compared to control.*

When roots were exposed to 25 nm TiO_2-NPs, no significant increase of Ti content in root was detected in rapeseed. In wheat roots, 25 nm TiO_2-NPs were less accumulated than 14 nm TiO_2-NPs. Local Ti content reached 12 and 36 mg Ti/kg DM in the parenchyma, respectively. Moreover, the distribution of 25 nm TiO_2-NPs differed from that of 14 nm TiO_2-NPs: NPs were mainly found in the vascular cylinder rather than in the parenchyma.

Root exposure – TiO_2 translocation to leaves

Since 14 nm and 25 nm TiO_2-NPs were detected in root vascular cylinder, we hypothesized that they could be transported to leaves, drained by the sap flow. To confirm this hypothesis, we used µPIXE and µXRF to detect Ti in plant leaves after root exposure to 14 nm TiO_2-NPs.

When performing µPIXE imaging (Figure 4), Ti level was very low in both plant species and distributed homogeneously throughout the section, as in control leaves. We did not detect any region where Ti content was higher than background concentration.

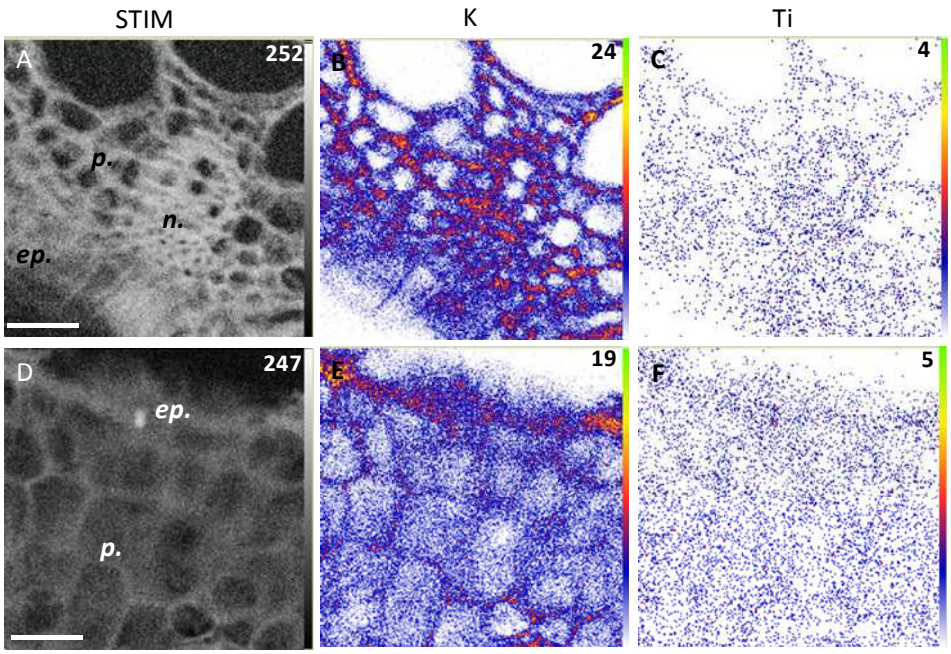


Figure 4: Ti distribution in leaves of wheat and rapeseed upon root exposure, analyzed by µPIXE. STIM (A, D), potassium distribution (B, E) and titanium distribution (C, F) were imaged. Leaves of wheat (A-C) and rapeseed (D-F) after root exposure to 100 mg/L of 14 nm TiO_2-NP suspension were analysed. Color scales on STIM, K and Ti distribution maps are in arbitrary units and represent the maximal count in the sample. Scale bar = 50 µm. n. nerve, p. parenchyma, ep. epidermis

Leaves of wheat and rapeseed were then analysed by µXRF (Figure 5). We detected Ti hot-spots in plant leaves, as shown by arrows in Figure 5B-C and Figure 5E-F. These Ti-rich regions were observed both in rapeseed and in wheat leaves; either in plantlets exposed to 14 nm NPs or in plantlets exposed to 25 nm NPs. We qualitatively observed that Ti content would be higher in plantlets exposed to 14 nm TiO_2-NPs: more Ti-rich regions were observed, and the maximum count per pixel was higher in plantlets exposed to 14 nm TiO_2-NPs than in plantlets exposed to 25 nm TiO_2-NPs.

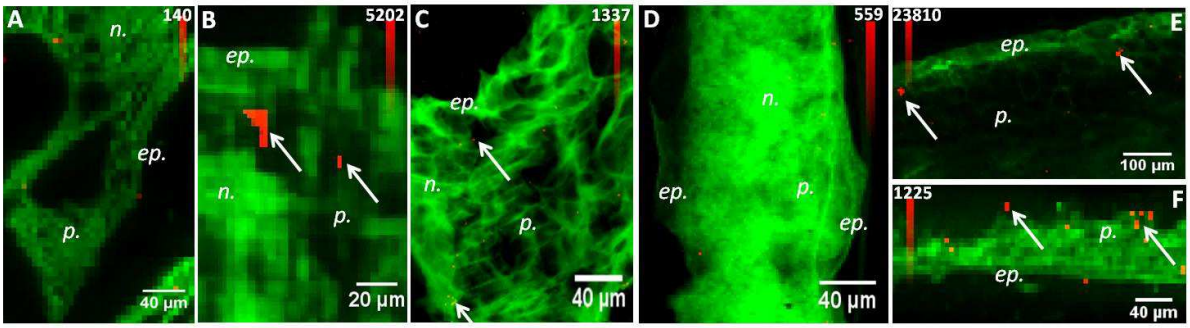


Figure 5: Ti distribution in leaves of wheat and rapeseed upon root exposure, analyzed by µXRF. Roots were grown in water (A-D) or exposed to 100 mg/L TiO_2 suspensions: 14 nm TiO_2-NPs (B, E) or 25 nm TiO_2-NPs (C, F). Images A, B, E and F were recorded on LUCIA beamline, SOLEIL, France (pixel size: 5 x 5 µm²). Images C and D were recorded on ID21 beamline, ESRF, France (pixel size: 1 x 1 µm²). In green, potassium distribution represents

plant tissues, in red, titanium distribution. Color intensity scale is proportional to the fluorescence counts of Ti, and the maximum number of counts is reported. Arrow: Ti-rich region, ep. epidermis, p. parenchyma, n. nerve

Root exposure – TiO_2 impact on plant development

The impact of exposure to different concentrations of TiO_2 suspensions (10, 50 or 100 mg/L) on wheat and rapeseed development was investigated by evaluation of germination rate (Figure 6A), root elongation (Figure 6B), dry biomass (Figure 6C) and ETP (Figure 6D).

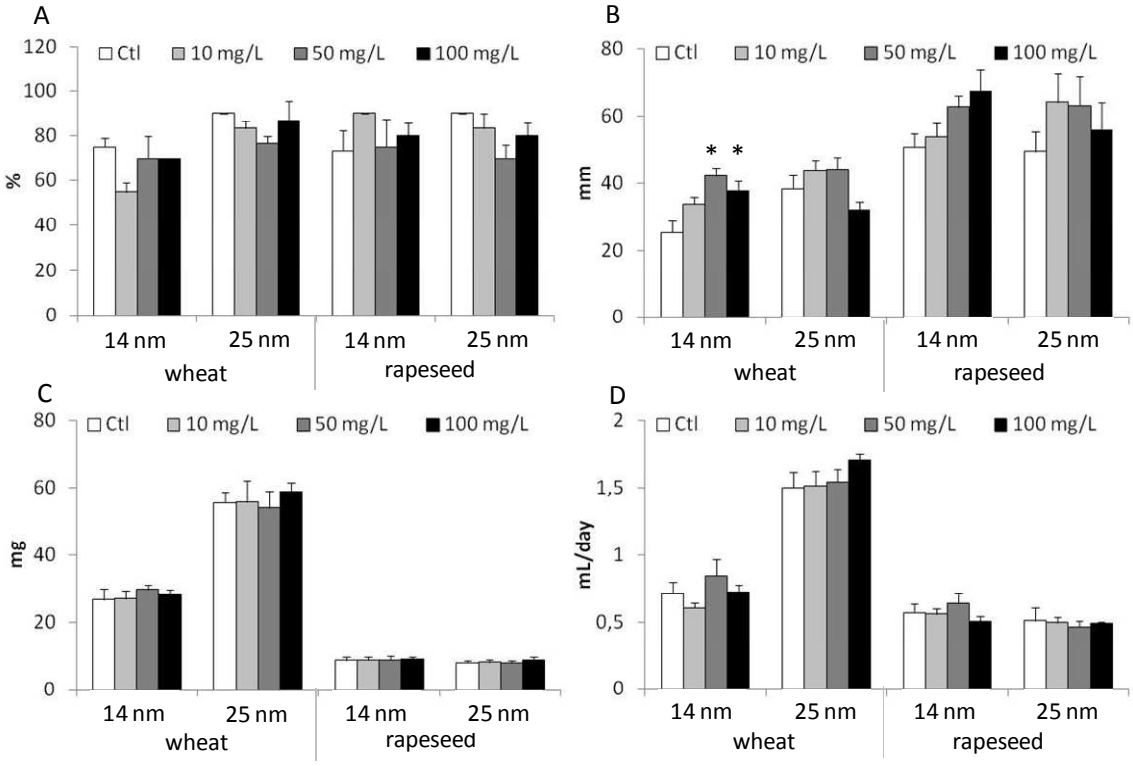


*Figure 6: TiO_2 impact on wheat and rapeseed development. Germination rate (A), root elongation (B), dry biomass (C) and evapotranspiration (D). *p<0.05 as compared to control.*

Induction of root elongation was observed in both plant species upon exposure to 14 nm TiO_2-NPs. In wheat, root elongation was significantly increased, up to 68%. In rapeseed, root length was increased of 31% though this induction was not statistically significant. Induction was not observed for plantlets exposed to 25 nm TiO_2-NPs. Conversely root exposure to TiO_2 did not impact the germination rate, dry biomass and ETP. Average germination rate for both species was 78%. Average dry biomass was 42 mg and 8 mg for wheat and rapeseed, respectively. Finally average ETP was 1.1 mL /day for wheat and 0.5 mL /day for rapeseed.

Leaf exposure – TiO_2 internalisation

Another exposure scenario was investigated: foliar exposure by wet deposition. A single leaf of a plantlet was soaked in 14 nm TiO_2-NPs suspension (100 mg/L) for one week. Sections of this exposed leaf were then analysed by µPIXE. This experiment was performed on wheat (Figure 7A-C) and rapeseed (Figure 7D-F). Ti distribution was homogeneous over the section and Ti level was low, as it was in control plants.

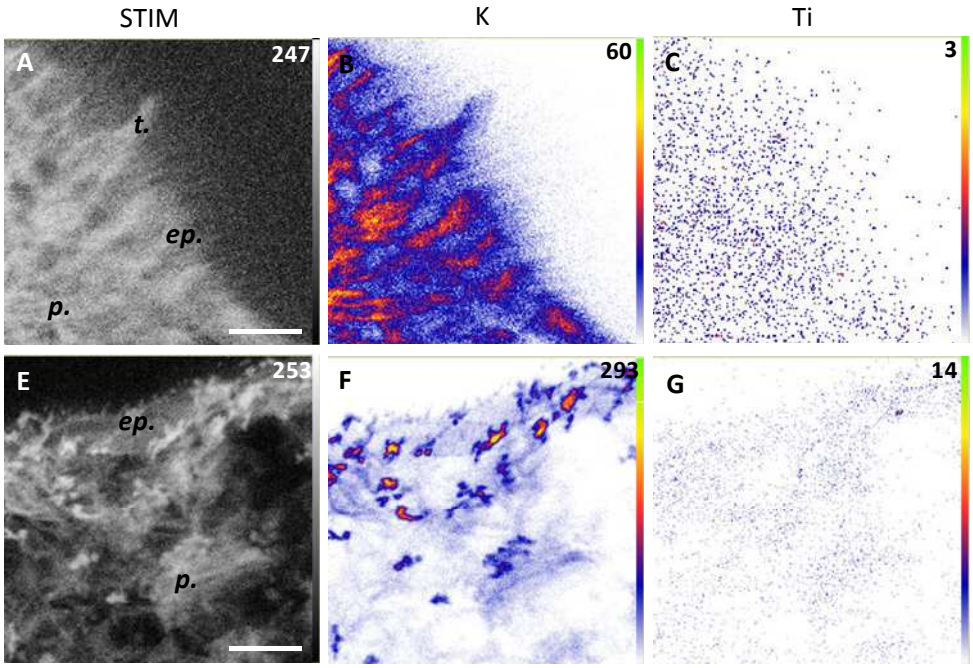


Figure 7: Ti distribution in leaves of wheat and rapeseed upon leaf exposure, analyzed by µPIXE. Leaf sections of wheat (A-C) and rapeseed (D-F) exposed to 14 nm TiO_2-NP suspension (100 mg/L). STIM (A, D), potassium distribution (B, D), titanium distribution (C, E). Color scales on STIM, K and Ti distribution maps are in arbitrary units and represent the maximal count in the sample. Scale bar = 50 µm. p. parenchyma, ep. epidermis, t. trichome

Leaves of rapeseed were then analysed by µXRF (Figure 8). First we imaged a leaf of control plantlet (plantlet grown in hydroponics in Hoagland and not exposed to TiO_2) (Figure 8A). Then leaves of exposed plantlets were observed: both the exposed leaf (Figure 8B) and a newly developed leaf (Figure 8C), the latter having grown during the course of plantlet exposure. Ti content was high and homogeneously distributed throughout the exposed leaf section (Figure 8B). The analysis of the newly developed leaf also showed some Ti hot-spots suggesting that Ti had been internalized in the exposed leaf and then transferred towards growing leaves. Note that this newly developed leaf had never been exposed to TiO_2-NP suspensions. These Ti-rich regions inside the newly developed leaf thus cannot be the result of an external contamination

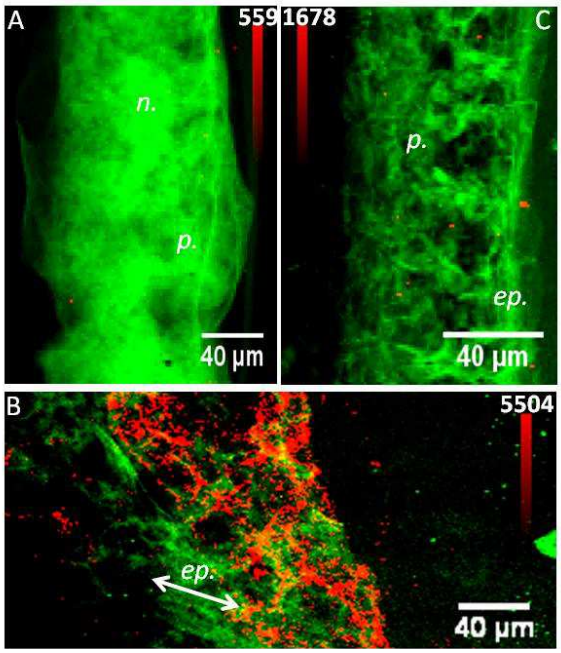


Figure 8: Ti distribution in leaves of rapeseed upon leaf exposure, analyzed by µXRF. Control leaf (not exposed) (A), leaf exposed to 14 nm TiO_2-NP suspension (100 mg/L) (B) or leaf which developed during the course of exposure (C) were imaged. Images were recorded on ID21 beamline, ESRF, France (pixel size: 1 x 1 µm²). In green, potassium distribution represents plant tissues, in red, titanium distribution. Color intensity scale is proportional to the fluorescence counts of Ti, and the maximum number of counts is reported. ep. epidermis, p. parenchyma, n. nerve

DISCUSSION

Root exposure: Internalization and Translocation of NPs

In the present article, we prove that TiO_2-NPs with diameter 14 and 25 nm are internalized in wheat and rapeseed roots and translocated to leaves upon root exposure. Moreover, we provide quantitative data of this accumulation in roots. 14 nm TiO_2-NPs are more accumulated in wheat (up to 35.5 mg Ti/kg DM) than 25 nm TiO_2-NPs are (up 18 mg Ti/kg DM). To the best of our knowledge, quantitative uptake of TiO_2-NPs has never been reported. Ti distribution between parenchyma and vascular cylinder differs according to the NP. When exposed to 14 nm TiO_2-NPs, Ti is more accumulated in the parenchyma than in the vascular cylinder. When exposed to 25 nm TiO_2-NPs, Ti is more accumulated in the vascular cylinder than in the parenchyma. This difference can be related to NP agglomeration status during plant exposure. Indeed, 25 nm TiO_2-NPs are not agglomerated in the exposure suspension whereas 14 nm TiO_2-NPs are agglomerated. The transfer of clusters of agglomerated NPs to root vascular cylinder would be reduced, resulting in their accumulation in the parenchyma. TiO_2-NP root accumulation has already been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* plantlets exposed to 3 nm TiO_2-NPs (Kurepa *et al.*, 2010). Due to their very small nominal diameter these NPs could penetrate plant roots, certainly *via* root pores. Recently, we also reported that TiO_2-NPs with diameters up to 20

nm (that is to say larger than root pores) can penetrate in wheat roots grown in hydroponics (Larue *et al.*, submitted). These two articles did not provide any quantitative data. Quantitative accumulation data have been reported for 7 and 25 nm CeO_2 (Lopez-Moreno *et al.*, 2010a; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2011b), 8 and 9 nm ZnO (Lin and Xing, 2008; Lopez-Moreno *et al.*, 2010a), 6 and 25 nm Ag (Yin *et al.*, 2011). Results show metal concentrations ranging from 140 to 7000 mg/kg DM. These concentrations are far above what we report in the present article. Except in the study of Zhang et al. (Zhang *et al.*, 2011b), ICP-MS or ICP-AES were used for all measurements. These techniques are based on metal quantification after lyses of total plant tissue. Consequently NPs both ad- and absorbed in plant tissues are quantified. In our experiment we quantified only Ti accumulated in plant parenchyma and vascular cylinder only, and not Ti adsorbed on root epidermis. We also measured Ti concentration on wheat epidermis. It was 911.2 mg Ti/kg DM. If this amount of Ti had been added to our quantification, Ti content plant roots would have reached the same order of magnitude than in the other published studies. These results emphasize the importance of distinguishing Ti adsorbed from Ti really absorbed in plant roots in order to obtain accurate data. Among these studies, two of them compare the differential uptake of 6-7 nm and 25 nm NPs showing that smaller NPs are more accumulated in plant roots than the larger ones (+ 50% for Ce and + 80% for Ag) (Zhang *et al.*, 2011b; Yin *et al.*, 2011). We confirm this result and show that 14 nm TiO_2-NPs are more accumulated in plant roots than 25 nm TiO_2-NPs.

We also demonstrate the translocation of TiO_2-NPs towards plant leaves. Moreover it seems that 14 nm TiO_2-NPs are more translocated that 25 nm TiO_2-NPs. One of our hypotheses to explain NP internalisation and transfer to leaves is their transport together with the water flow. Water flow in plants is driven by evapotranspiration and thus is linked to plant foliar surface. This hypothesis can explain that Ce is much more accumulated in cucumber plantlets (up to 750 mg/kg) (Zhang *et al.*, 2011b), that have a bigger foliar surface, than in wheat plantlets.

Root Exposure: NP Impact on Plant Development

Regarding TiO_2-NP impact on plant development, in our exposure conditions we only observe increased root length after exposure to 14 nm TiO_2-NPs. This result confirms those of our previous study (Larue *et al.*, submitted). It is also interesting to notice that the induction of root elongation is only significant for the two smallest NPs (14 and 20 nm) (Larue *et al.*, submitted) whereas it is not significant for NPs with 25 nm diameter. A review highlighted that NPs acquire new properties in the 20-30 nm range (Auffan *et al.*, 2009). As we hypothesized previously, smaller NPs with a higher surface reactivity might enlarge root pores or create new ones, leading to higher hydromineral flow in roots. In turn, this increased nutrient uptake may explain the increased of root length. In the literature, some authors report adverse effects of TiO_2-NPs on plant development (Asli and Neumann, 2009;

Castiglione *et al.*, 2011) while others report inductive effects (Zheng *et al.*, 2005) or no effects (Seeger *et al.*, 2009). In these articles, NP preparation and characterisation are only described in one of them (Seeger *et al.*, 2009) making it impossible the comparison of these results.

Comparative Impact and Accumulation of TiO_2 according to Plant Species

The first aim of our study was to compare the behaviour of two plant species after exposure of roots to NPs. It appears that TiO_2-NP exposure had the same impact on wheat and rapeseed development: root induction when exposed to 14 nm TiO_2-NPs. Ti distribution was the same for both species: more Ti was detected on root epidermis, less Ti was mapped in the parenchyma and finally few Ti was seen inside the vascular cylinder. Nevertheless, all the data indicate that rapeseed accumulates more Ti than wheat. This higher accumulation may be linked with its well known hyperaccumulating properties for heavy metals (McCutcheon and Schnoor, 2003). This conclusion was also drawn on a comparative study on uranium uptake in wheat and rapeseed (Laurette *et al.*, 2012). Uranium uptake in rapeseed was higher (2800 ppm) than in wheat plantlets (350 ppm). Another explanation can be that rapeseed has a higher ETP relatively to its foliar surface (data not shown). The consequence is that the water flow would proportionally be more intense in rapeseed than in wheat, leading to higher accumulation of NPs. In the literature, no trend according to plant species or family (monocot or dicots) can be evidenced. Results on NP impact on plant development (Garcia *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Lin and Xing, 2008; Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Ma *et al.*, 2010b; Yang *et al.*, 2006) and accumulation (Lopez-Moreno *et al.*, 2010b; Zhu *et al.*, 2008) differ according to plant species and NP type. Since plant/NP interaction mechanisms are still unknown, it is not possible to generalize the results found here. More comparative studies would be needed.

Foliar Exposure: Internalization and Translocation of NPs

µXRF on synchrotron made it possible to demonstrate that 14 nm TiO_2-NPs are taken up in the exposed leaf of rapeseed. Then some of these NPs were transferred towards leaves in development. This mode of contamination has only been investigated twice. First, fluorescent polystyrene NPs (43 nm) were deposited as single droplets on plant leaves. These NPs were accumulated in *Vicia faba* leaves (Eichert *et al.*, 2008). Second, *Zea mays* leaves have been sprayed with CeO_2-NPs (37 nm) (Birbaum *et al.*, 2010). ICP-MS analyses evidence increased Ce content in exposed leaves but it was not possible with this technique to differentiate between absorbed Ce and adsorbed one. Thus authors concluded that there were no evidences of NP internalization in corn. The discrepancies between these results can come from the nature of the deposition. Indeed, when NPs were applied on leaves by a wet deposition (total immersion or droplets), as in our study or the one of Eichert et al., NPs were internalized. In contrast, when they were sprayed on the leaf surface, as in the study

by Birbaum et al. (Birbaum *et al.*, 2010), no NPs were detected in leaves. Thus, leaf immersion (partial or total) in NP suspension is a much more drastic exposure condition than NP spraying.

CONCLUSION

In the present article we prove that TiO_2-NPs are internalized in wheat and rapeseed roots and transferred to their leaves upon root hydroponics exposure. In both plant species, NPs with smaller diameters are more accumulated than larger ones. Moreover only the smallest NPs modulate plant development, inducing an increase of root length. We also demonstrate foliar uptake of NPs after a wet deposition. Lastly, rapeseed accumulates more NPs than wheat. It would be of interest to identify if this effect is only species dependant or if it is a common property to all dicotyledonous plants.

Few data are available on the impact of NPs on plants. Thus first steps in research are dedicated to study it in a simple system (exposure in ultrapure water with high doses of NPs). Our results need to be confronted with results obtained after exposure in soils and with lower doses of NPs, which would be more relevant of environmental exposure conditions.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the region Ile de France through the framework C'nano Ile de France. C. Larue was supported by a fellowship from the ADEME and CEA, and this work was performed within the framework of the iCEINT research consortium. The authors would like to thank the European Synchrotron Radiation Facility and SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities at ID21 and LUCIA.

RESUME

Dans le contexte du développement exponentiel des nanotechnologies, les nanomatériaux sont susceptibles de se disséminer dans l'environnement. Les végétaux sont un élément sensible des écosystèmes car ils constituent une interface entre l'eau, le sol et l'air et se situent à la base de la chaine trophique.

Cette étude avait pour but d'évaluer l'impact des nanoparticules de TiO_2 et des nanotubes de carbone sur les végétaux, et plus particulièrement sur le blé et le colza. L'accent a également était mis sur la caractérisation des nanomatériaux employés.

Nous avons mis en évidence l'accumulation racinaire et le transfert vers les feuilles des nanoparticules de TiO_2 et des NTC dans le blé et le colza après une exposition en hydroponie. Les nanoparticules de TiO_2 sont également accumulées dans les plantes lors d'une exposition racinaire sur sol ou encore lors d'une exposition par voie aérienne. Les nanoparticules de TiO_2 s'accumulent dans les végétaux à hauteur de quelques dizaines voire centaines de mg Ti/kg MS, leur phase cristalline n'est pas modifiée et ces nanoparticules ne se dissolvent pas lors de leur transfert dans le végétal. Les NTC s'accumulent en plus faible quantité (centaines de µg NTC/kg MS).

Ces nanomatériaux affectent peu le développement des végétaux. Sur huit tests réalisés, seule l'élongation racinaire s'est révélée être un critère sensible, avec une induction de l'élongation après exposition aux NPs et aux NTC présentant un diamètre nominal inférieur ou égal à 20 nm.

Enfin, une nette influence du diamètre nominal des nanomatériaux a pu être mise en évidence, contrôlant ainsi leur internalisation, leur transfert et leurs effets biologiques sur les végétaux.

MOTS CLEFS : Ecotoxicologie, nanomatériaux, TiO_2, NTC, blé, colza

---

ABSTRACT

The field of the nanotechnology exponentially increased during the last ten years. Intensive production of nanomaterials would lead to their release in the environment. Plants are one of the most sensitive organisms since they are at the interface between soil, water and air. Moreover, they represent a point of entry into the food chain.

This study deals with the impact of TiO_2 nanoparticle and carbon nanotube on plants, specifically on wheat and rapeseed. The physico-chemistry of nanomaterials has been deeply characterized.

We prove that TiO_2 nanoparticles and carbon nanotubes are internalized in roots and transferred to shoot of both wheat and rapeseed upon hydroponics exposure. TiO_2 nanoparticles can also be internalized upon exposure in soil and even after an aerial contamination. TiO_2 nanoparticles are accumulated in plants up to few hundred mg Ti/kg DM, their crystal phase is not modified and they do not dissolve during their transfer inside plants. CNTs are less accumulated, up to few hundred µg CNTs/kg DM.

The nanomaterials we studied have very limited impact on plant development and physiology. One test out of eight has shown modulation after nanomaterial exposure: root elongation was induced when exposed to very small nanomaterials (≤20 nm).

Finally, we show that the nominal diameter of nanomaterials is correlated with their internalization, transfer to shoot and induction of root elongation: the finest the nanomaterial, the highest their internalization and impact on plant development.

KEY WORDS: Ecotoxicology, nanomaterials, TiO_2, CNT, wheat, rapeseed